



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 044**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/47** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)  
**A61K 47/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07856330 .1**  
96 Fecha de presentación : **30.11.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2121742**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.11.2009**

54 Título: **Péptidos específicos para las metástasis y sus aplicaciones en diagnóstico y terapéuticas.**

30 Prioridad: **30.11.2006 IT T006A0852**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**19.07.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**19.07.2011**

73 Titular/es: **Università degli Studi di Torino**  
**Via Verdi 8**  
**10100 Torino, IT**

72 Inventor/es: **Bussolino, Federico y**  
**Marchiò, Serena**

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 363 044 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Péptidos específicos para las metástasis y sus aplicaciones en diagnóstico y terapéuticas.

### ESTADO DE LA TÉCNICA DEL INVENTO

5 El presente invento comprende unos péptidos que son altamente específicos para células metastásicas de tumores, en particular células de metástasis hepáticas, y su aplicación en los sectores de diagnóstico y terapéuticos.

### ANTECEDENTES TÉCNICOS DEL INVENTO

#### Tumor y metastatización

10 La tumorigénesis es un proceso de múltiples etapas, en el cual algunas células evolucionan progresivamente hacia la malignidad. El conocimiento actual en el campo de la neoplasia subraya que el cáncer es una enfermedad inducida por cambios dinámicos del genoma. A través de estas variaciones, las células de tumores adquieren independencia con respecto de diversos mecanismos que controlan las funciones fisiológicas del organismo. Como consecuencia de esto, ellas resultan capaces de (1) crecer continuamente, (2) inducir el reclutamiento de células endoteliales para la formación de nuevos vasos sanguíneos y (3) colonizar órganos diferentes del de origen.

15 La capacidad proliferativa de las células tumorales es debida fundamentalmente a dos mecanismos. En primer lugar, mientras que las células normales necesitan unos factores mitogénicos para cambiar desde un estado quieto a un estado activo, en proliferación, en las células tumorales, las mutaciones y/o la sobreexpresión de receptores de factores de crecimiento pueden inducir la cascada de proliferación independientemente de la presencia de un ligando. Además, en muchos casos, las células tumorales adquieren la capacidad de sintetizar unos factores solubles, a los que ellas son sensibles. Así, se establece una estimulación autocrina, que aumenta aún más el crecimiento de un tumor. El otro fenómeno de desregulación del crecimiento de las células en tumores es la resistencia a una apoptosis (muerte celular programada). Este mecanismo, fundamental en el crecimiento y la remodelación de órganos durante el desarrollo fisiológico, es inducido también en el caso de daños no reversibles en el genoma, para evitar la expansión de una población de células aberrantes. Algunas células, sin embargo, pueden escapar de esta clase de protección y se vuelven independientes, favoreciendo de esta manera la propagación de mutaciones y la consiguiente progresión neoplásica.

20 Una masa tumoral primordial está constituida por un pequeño número de células, y no podría desarrollarse por encima de un diámetro de 2 mm si no es apoyada por una alimentación adecuada y el soporte con oxígeno. Esta es la fase en la que una angiogénesis, es decir la formación de nuevos capilares sanguíneos a partir de vasos sanguíneos previamente existentes, es estimulada en alto grado por las células tumorales propiamente dichas. El desequilibrio entre señales positivas y negativas de la regulación de una angiogénesis conduce a la neoformación de una red vascular que penetra en, y alimenta a, la masa tumoral que está proliferando activamente. Los vasos sanguíneos de un tumor, además de proporcionar la nutrición, tienen la función de transportar células malignas hacia otros distritos del cuerpo.

35 La progresión de un tumor evoluciona hacia una etapa de irreversibilidad, cuya particularidad característica es una metastatización. En este proceso, unas células pioneras escapan desde la masa tumoral primaria. Unas vez que han entrado dentro de los capilares que rellenan el tumor, ellas llegan al torrente sanguíneo, que las transporta a unas regiones distantes del sitio de derivación, en donde ellas darán origen a un tumor secundario.

40 El desarrollo de una metástasis representa un suceso biológico complejo, relacionado con las interacciones entre unos factores intrínsecos del organismo (condiciones generales, integridad de la respuesta inmunitaria) y unas características específicas de las células tumorales (localización, tamaño y modelos histológicos). Desde el sitio primario microscópico, la difusión de células tumorales es primeramente local, pasando por una diseminación centrífuga. Por producción de unas proteasas que degradan a las conexiones intercelulares y a la matriz extracelular, las células tumorales invaden a unas estructuras anatómicas y a unos tejidos que son escasamente resistentes (tejido graso, vainas nerviosas, médula ósea).

45 Un primer obstáculo para la difusión metastásica es ofrecido por la presencia de unas estructuras relativamente impenetrables, tales como las cápsulas de órganos, un cartílago o periostio, la meninge. Debido a la dificultad de ir más allá de estos límites, una metastatización en sitios distantes debe de seguir unas etapas que se pueden resumir de la siguiente manera: (1) entrada en la red capilar de un tumor por un mecanismo denominado "intravasación", (2) transporte a través del torrente sanguíneo, (3) reconocimiento específico del endotelio de destino, (4) salida desde el capilar por un mecanismo denominado "extravasación" y (5) desarrollo de una metástasis, soportado por una angiogénesis activa.

50 El éxito de una diseminación depende de las características anatómicas y de los factores hemodinámicos del organismo anfitrión, y de las interacciones que pueden experimentar las células tumorales con el endotelio que reviste a los vasos sanguíneos. Las rutas de difusión más corrientes son los vasos (linfáticos y sanguíneos) y las cavidades celomáticas. Los vasos linfáticos son penetrados con bastante facilidad, a causa de la ausencia de una

5 lámina basal. Así, las células tumorales pueden transitar con facilidad dentro de los nódulos linfáticos, antes de entrar en el sistema venoso a través de las conexiones linfáticas y venosas. El transporte dentro de los vasos puede afectar al sistema tanto arterial como venoso, incluso aunque la invasión venosa es más corriente, puesto que la circulación venosa recoge el flujo que sale desde ciertos órganos. Ejemplos típicos son la vena sistémica para el pulmón y la vena porta para el hígado. La diseminación trans-celomática concierne en vez de ello a la cavidad pleural del pecho y a los espacios peritoneales del abdomen y de la pelvis. El sitio más corrientemente implicado es el peritoneo, en donde, después de verter líquidos debido a la obstrucción de las venas hepáticas, las células tumorales son recogidas en el fluido ascítico. Los cánceres de estómago, colón, páncreas y ovario adoptan usualmente este sistema.

10 Las células metastásicas de tumores expresan unos específicos determinantes moleculares que contribuyen de diversas maneras a la metástasis propiamente dicha. La distribución de una metástasis no es casual, pero cada tumor tiene unas direcciones preferentes, esto es conocido como órgano-tropismo. El hígado es un órgano objetivo para tumores colorrectales; los huesos lo son para tumores de próstata y ovarios; y los pulmones lo son para tumores de testículos, huesos y mamas. Los pulmones y el hígado, debido a su función de filtración y a la presencia de un enorme número de capilares, pueden recibir metástasis virtualmente a partir de cualquier órgano y también envían colonias de tumores, principalmente hacia el cerebro y los huesos.

20 El hígado es un sitio corriente para lesiones metastásicas. La razón de ello ha de ser buscada e investigada en la organización funcional y estructural del distrito hepático. La vena porta, que evacua la sangre hacia las vísceras abdominales, representa el conducto a través del cual las células que proceden de los tumores primarios son vehiculadas hacia el hígado. La adhesión de células tumorales circulantes al endotelio de un hígado es una etapa crítica para el comienzo de una metastatización. Las metástasis hepáticas se desarrollan como una consecuencia de la invasión del parénquima hepático por estos trombos de células.

25 El alto volumen de un flujo sanguíneo hepático (aproximadamente un 25 % del flujo cardíaco), y la anatomía microscópica particular de los sinusoides son los factores que favorecen la diseminación hepática. El tumor primario puede ser localizado en el tracto gastrointestinal, es decir en el colon, el recto, el estómago, el páncreas, el tracto biliar y el vientre. A éstos, se les pueden añadir también los tumores de las mamas y de los pulmones.

#### Tumor colorrectal

30 Existen diferentes clases de clasificaciones que, en general, dividen la evolución progresiva de la enfermedad en unas etapas caracterizadas por el grado de invasión del cuerpo por ese tumor. Las clasificaciones de Dukes y MAC (acrónimo de Modified Astler-Coller = Astler-Coller modificada), propuestas al comienzo de los estudios clínicos, son ahora las menos usadas. Generalmente se prefiere la clasificación de TNM (acrónimo de Tumor Node Metastasis = metástasis de nódulos tumorales) la cual incluye cuatro etapas sucesivas:

- etapa I: el tumor está limitado a la mucosa y a la submucosa;
- etapa II: hay extensión a unas capas más profundas de la pared intestinal;
- 35 - etapa III: hay invasión de la subserosa y de los nódulos linfáticos;
- etapa IV: metástasis.

Los enfoques terapéuticos más corrientes en el momento actual son una cirugía, una quimioterapia y una radioterapia. La clase de estrategia clínica se escoge basándose en la etapa en la que se encuentre la patología. En general, se usan los siguientes protocolos:

- 40 - etapa I: una cirugía (colostomía);
- etapa II: una cirugía puede ser asociada con una quimioterapia
- etapa III: una cirugía está asociada en cualquier caso con una quimioterapia;
- etapa IV: un tratamiento paliativo con cirugía y/o quimioterapia.

45 El hígado es el sitio más frecuente de colonización por un cáncer colorrectal primario. Actualmente el único tratamiento que tiene un potencial curativo es la eliminación quirúrgica de las metástasis. No obstante, a pesar de los medios crecientemente eficaces de la cirugía hepática, la mayor parte de los pacientes con metástasis hepáticas no se pueden llevar a una cirugía, a causa de la extensión de su masa tumoral.

#### Un enfoque diferente para una terapia de cáncer: atacar a los vasos sanguíneos de un tumor

50 Los fármacos quimioterapéuticos actualmente usados se encuentran entre los fármacos que tienen la ventana terapéutica más estrecha en todo el campo médico. Como consecuencia, la dosis de los fármacos antitumorales que se pueden administrar está limitada por los efectos tóxicos sobre los tejidos normales. Esta dificultad se puede superar dirigiendo los fármacos citotóxicos hacia el objetivo del tumor propiamente dicho. Incluso

5 aunque ésta ha sido una meta durante largo tiempo en la biología del cáncer y en la medicina oncológica, en realidad se conocen ahora solamente unos pocos ejemplos en los cuales es posible la administración de un fármaco dirigida a un objetivo. Por ejemplo, el uso de anticuerpos monoclonales contra antígenos tumorales tuvo un éxito limitado, puesto que se conocen solamente unos pocos antígenos tumorales y generalmente los anticuerpos penetran mal dentro de los tejidos. Además, puesto que las células tumorales son genéticamente inestables y se acumulan unas mutaciones ventajosas para el crecimiento, los tratamientos dirigidos hacia un objetivo de células tumorales son seguidos generalmente por una selección clonal de células resistentes.

10 La dirección hacia un objetivo de una terapia hacia la red vascular tumoral permite solventar algunos de los problemas relacionados con una terapia tradicional. Las células endoteliales en el sistema vascular de un tumor expresan unas moléculas peculiares de vasos angiogénicos. La dirección hacia un objetivo vascular ofrece varias ventajas. En primer lugar, el revestimiento endotelial es fácilmente accesible. Por el contrario, un fármaco dirigido hacia el objetivo de un tumor necesita difundirse en largas distancias, penetrar dentro de células tumorales estrechamente delimitadas y fijadas y en un estroma muy denso, y contrasta con una presión intersticial muy alta. En segundo lugar, puesto que las células tumorales dependen del suministro de sangre para su crecimiento, una terapia de un tumor dirigida hacia los vasos no necesita conducir a la destrucción de todas las células endoteliales. Desde luego, una terapia dirigida hacia un objetivo del endotelio tiene un mecanismo intrínseco de amplificación. Finalmente, puesto que las células endoteliales son diploides y no están transformadas, es improbable que ellas aflojen y suelten la expresión de un receptor superficial o adquieran resistencia a fármacos por medio de mutaciones y de una evolución clonal. Recientemente, se han identificado algunos marcadores endoteliales. Entre estas moléculas se encuentran algunas integrinas, particularmente las  $\alpha\beta3$  y  $\alpha\beta5$  y receptores de tirosina cinasas endoteliales con sus ligandos consanguíneos (receptores de VEGF y los diversos VEGF's, Tie1, Tie2 y angiopoietinas).

#### Péptidos que dirigen hacia un objetivo a un modelo en ratón de tumor humano: descubrimiento de marcadores endoteliales de tumores

25 Mediante unos estudios de presentación en fagos, realizados in vivo en diferentes modelos en animales, se han identificado unas secuencias de péptidos que son capaces de dirigir hacia un objetivo de manera selectiva la vascularización de tumores. Estas secuencias probaron ser un instrumento válido para caracterizar el endotelio de un tumor y sus determinantes moleculares específicos; y desarrollar aplicaciones biotecnológicas en la terapia de los tumores.

30 De esta manera, se han identificado unas secuencias de péptidos recurrentes, tales como la de RGD (Arginina-Glicina-Ácido aspártico) y la de NGR (Asparagina-Glicina-Arginina). El motivo RGD está embebido en la secuencia de varias proteínas de la matriz extracelular y representa su sitio de integración con integrinas. Un fago que presenta la secuencia CDRGDCFC, denominado RGD-4C, es capaz de dirigirse específicamente hacia un objetivo de tumores de mama, y fijar selectivamente las integrinas  $\alpha\beta3$  y  $\alpha\beta5$ . Unos experimentos in vitro demostraron que los péptidos que contienen el RGD inducen la adhesión de una célula con otra célula, induciendo de esta manera una apoptosis. Así, se ha creído que el péptido RGD, sin ninguna modificación adicional, puede actuar como un fármaco antiangiogénico, conduciendo a la muerte celular después de una interrupción de las interacciones entre una célula y una matriz. También el péptido NGR fija a integrinas, aunque con menor afinidad en comparación con el RGD. El receptor específico para la secuencia NGR ha sido identificado sucesivamente en otra proteína de membrana, la aminopeptidasa N (APN), sobreexpresada en estructuras vasculares en una angiogénesis activa y no detectable en un endotelio quieto. Se ha demostrado que unos anticuerpos específicos para la APN pueden inhibir una neovascularización de la retina inducida por una hipoxia en un ratón. De la misma manera, unos ratones tratados con anticuerpos anti-APN han hecho retroceder fuertemente a los tumores de mama en comparación con el conjunto testigo.

45 En otro conjunto de estudios se han identificado unos péptidos que fijan específicamente al proteoglicano NG2, un homólogo del HMP (acrónimo de human melanoma proteoglycan = proteoglicano de melanoma humano) también conocido como Antígeno Asociado con un Melanoma de Alto Peso Molecular. Este proteoglicano es expresado principalmente por células progenitoras gliales, un músculo y un cartílago del esqueleto. Después de la diferenciación se pierde la expresión en la superficie del NG2. En adultos, su presencia está limitada a unos vasos a angiogénesis activa en algunas clases de tumores, entre los cuales se encuentran un glioblastoma, un condrosarcoma, un melanoma y algunas leucemias. En un ratón desprovisto de inmunidad ("desnudo") que es portador de un melanoma maligno, un anticuerpo anti-NG2 conjugado con doxorubicina, suprime el crecimiento de un tumor.

#### Péptidos como fármacos antitumorales

55 La remodelación de la matriz extracelular es común tanto para una activación endotelial como para una invasión neoplásica, y necesita la acción de unas enzimas particulares denominadas Metallo-Proteasas de Matriz (MMP, acrónimo de Matrix Metallo-Proteases). Estas proteasas, sobreexpresadas en el tumor, están casi ausentes en tejidos normales, excepto en sucesos de migración celular y de remodelación de tejidos durante una morfogénesis. Unos agentes inhibidores sintéticos de dos de tales proteasas, MMP-2 (gelatinasa A; de 72 Kd) y MMP-9 (gelatinasa B; 92 de Kd) que son las proteasas más estrictamente implicadas en una angiogénesis y en un

5 potencial metastásico, han sido aislados por presentación en fagos. A partir de este estudio, se ha mostrado que los clones más representados expresan la secuencia LRSGRG derivada de una biblioteca CX6C. Otra familia de proteínas, identificada a partir de una colección CX9, es la que tiene el motivo HWGF. Unos péptidos solubles, que contienen el motivo HWGF, muestran una actividad inhibitoria in vitro contra la MMP-9. Estos péptidos inhiben la migración de linajes de células tumorales y de células endoteliales que se derivan de un cordón umbilical humano. In vivo, ellos son eficientes para inhibir el crecimiento de un tumor y para impedir la aparición de metástasis.

#### Uso de péptidos en unas terapias antitumorales innovadoras biotecnológicamente

10 Tal como antes se ha descrito, unos péptidos que están asociados específicamente a marcadores endoteliales de tumores o a células de tumores, se han empleado con éxito en protocolos terapéuticos en un ratón. Se ha investigado un segundo enfoque, que conjuga a los péptidos RGD-4C y CNGRC con el fármaco quimioterapéutico doxorubicina, y usa a este compuesto para el tratamiento de tumores de mama en ratones. Los animales sometidos a esta terapia sobrevivieron hasta durante seis meses, demostrando que este compuesto es capaz de inhibir tanto a tumores primarios como al desarrollo de metástasis con mayor eficacia y menor toxicidad en comparación con una administración por vía sistémica.

15 En un tercer conjunto de aplicaciones, se han preparado unos péptidos quiméricos, que poseen dos dominios funcionales. El primero de ellos se puede fijar selectivamente a la célula objetivo y puede ser internalizado; el último es pro-apoptótico, no tóxico en fluidos corporales pero solamente en el entorno intracelular. Existen más de 100 péptidos que actúan causando la destrucción de membranas mitocondriales y la inducción de apoptosis. Entre éstos, se ha seleccionado una secuencia de 14 aa (aminoácidos), KLAKLAKKLAKLAK, que demostró tener un fuerte potencial antibiótico en la forma del enantiómero D. Los péptidos RGD-4C y CNGRC han sido acoplados con este péptido. Se ha encontrado que estos compuestos causan alteraciones mitocondriales y conducen a unas variaciones morfológicas que son típicas de un estado apoptótico, tales como condensación y fragmentación de las estructuras nucleares. Estos resultados han sido confirmados in vivo: unos ratones, a los que se ha administrado el agente antitumoral, muestran unos tumores de tamaño reducido y sobreviven durante varios meses.

#### DESCRIPCIÓN GENERAL DEL INVENTO

30 La aparición de unas metástasis es un factor de pronóstico desfavorable en la progresión de tumores. Así, es fundamental desarrollar unos métodos que permitan detectar y atacar a unas metástasis precoces (es decir subdimensionadas clínicamente). En la mayor parte de los casos, los métodos histo-patológicos actualmente empleados para una diagnosis permiten seguir y vigilar la localización de metástasis, cuando ellas ya no son aptas para tratarse. Además, desde un punto de vista terapéutico, los actuales enfoques están limitados principalmente debido a la toxicidad inespecífica de unos fármacos quimioterapéuticos.

35 Las células metastásicas tienen una característica peculiar, en comparación tanto con los tumores primarios como con los tejidos en los que ellos se localizan. De la misma manera, las células de vasos sanguíneos de tumores (células endoteliales) son diferentes de las normales, que están quietas. En particular, unas modificaciones significativas implican a las superficies celulares, sobre las cuales se expresan o modifican unas moléculas para favorecer la adaptación al nuevo entorno. Los métodos clásicos de estudio, sin embargo, han probado ser ineficaces para afrontar el problema de la multiplicidad de estas modificaciones.

40 El presente invento tiene la meta de proporcionar una solución para superar las deficiencias del estado de la técnica.

45 De acuerdo con el presente invento, esta meta es alcanzada por unos péptidos como se definen en las reivindicaciones adjuntas, particularmente con unos péptidos que comprenden una secuencia tal como se muestra en las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 6, 7, 96, 110, 111, 113, 115, 117 y 119. El invento concierne también al uso de tales péptidos en los campos terapéutico y diagnóstico. Las reivindicaciones adjuntas son parte del avance técnico proporcionado aquí en relación con el invento.

50 Preferiblemente, el presente invento, concierne a unos péptidos que reconocen específicamente a células metastásicas hepáticas. El invento concierne también al uso de compuestos conjugados y de formulaciones de dichos péptidos, cuando ellos/ellas están fijados a un agente de diagnóstico (por ejemplo, a una marca o etiqueta) o a un agente terapéutico (por ejemplo, a un agente quimioterapéutico, un isótopo radiactivo o una toxina), respectivamente, para la localización tanto in vitro como in vivo de células metastásicas hepáticas y para la terapia en un individuo que es portador de un tumor.

55 El presente invento puede proporcionar unos péptidos con una alta selectividad de fijación hacia células metastásicas, particularmente hacia células metastásicas hepáticas, permitiendo de esta manera una localización eficiente de dichas células tanto in vitro como in vivo, de manera que ellos se puedan emplear con éxito tanto para el diagnóstico como para la terapia de tumores que se metastatizan en el hígado, más particularmente cánceres colorrectales primarios.

Los péptidos del invento comparten el motivo de secuencia común LRS.

Más allá del enfoque terapéutico, los péptidos que reconocen selectivamente a células metastásicas hepáticas representan un medio útil para identificar a las metástasis propiamente dichas. El pequeño tamaño de estos péptidos es muy ventajoso para esta clase de aplicaciones. Por ejemplo, se pueden usar unos péptidos conjugados con radionúclidos o agentes fluorescentes, de acuerdo con el presente invento, en pacientes con tumores ocultos o con unos resultados radiológicos no específicos. Además, ellos se pueden usar para aplicaciones in vivo, tales como por ejemplo una resonancia magnética o un TAC, después de una conjugación con moléculas apropiadas para su visualización por cualquier técnica conocida de visualización, particularmente una técnica apropiada para una región corporal individual.

Se conocen en la especialidad detalles acerca de las técnicas de formulación y de administración de compuestos conjugados y no necesitan aquí una descripción detallada, de la que se puede prescindir para la comprensión del invento.

Los autores del presente invento usaron un enfoque proteómico (presentación en fagos) para caracterizar a los determinantes moleculares expresados en la superficie de células derivadas de metástasis hepáticas humanas que son secundarias para carcinomas colorrectales. Dicha técnica permitió el aislamiento de unos péptidos que pueden interactuar con las moléculas de membranas presentes exclusivamente en estas células. La identificación de unos péptidos que reconocen a unos determinantes moleculares que no están presentes en tejidos normales o en el tumor primario, permite usar dichos péptidos para aplicaciones tanto de diagnóstico como terapéuticas. Desde un punto de vista de diagnóstico, estos péptidos, marcados de una manera apropiada, se pueden usar para la detección de metástasis hepáticas también en etapas preclínicas. Desde un punto de vista terapéutico, es posible conjugarlos con fármacos quimioterapéuticos con el fin de ajustar los protocolos de una terapia objetivo.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 ilustra las secuencias de los péptidos que fijan a las células metastásicas hepáticas, particularmente las SEQ ID NO:1-7 representan a los péptidos que han sido estudiados profundamente, seleccionados en los experimentos realizados con los pacientes 16, 17 y 18; las SEQ ID NO:8-19 representan a los péptidos seleccionados en la III ronda de selección en una muestra procedente del paciente 2; las SEQ ID NO:20-39 representan a los péptidos seleccionados en la II ronda de selección con una muestra procedente del paciente 6; las SEQ ID NO:40-64 representan a los péptidos seleccionados en la III ronda de selección con una muestra procedente del paciente 7; las SEQ ID NO:65-78 representan a los péptidos seleccionados en la II ronda de selección en una muestra procedente del paciente 8; las SEQ ID NO:79-95 representan a los péptidos seleccionados en la II ronda de selección en una muestra procedente del paciente 16; las SEQ ID NO:96-107 representan a los péptidos seleccionados en la III ronda de selección en una muestra procedente del paciente 16; la SEQ ID NO:108-109 representan a los péptidos seleccionados en la III ronda de selección en una muestra procedente del paciente 17; las SEQ ID NO:110-118 representan a los péptidos seleccionados en la III ronda de selección en una muestra procedente del paciente 18; las SEQ ID NO:119-122 representan a los péptidos seleccionados en la IV ronda de selección en una muestra procedente del paciente 19; las SEQ ID NO:123-140 representan a los péptidos seleccionados en la IV ronda de selección en una muestra procedente del paciente 9; las SEQ ID NO: 141-152 representan a los péptidos seleccionados en la IV ronda de selección en una muestra procedente del paciente 21; las SEQ ID NO: 153-170 representan a los péptidos seleccionados en la II ronda de selección en una muestra procedente del paciente 23; las SEQ ID NO:171-186 representan a los péptidos seleccionados en la IV ronda de selección en una muestra procedente del paciente 5; y las SEQ ID NO: 187-201 representan a los péptidos seleccionados en la II ronda de selección en una muestra procedente del paciente 8.

La Figura 2 ilustra la secuencia de nucleótidos del cebador usado para secuenciar el inserto de oligonucleótidos en el ADN de fago;

La Figura 3 ilustra una imagen del gel de poli(acrilamida) en el que han sido separadas las proteínas fijadas al péptido GIYRLRS fusionado con una secuencia GST.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL INVENTO

El invento será descrito ahora con detalle, como un ejemplo no limitativo.

Los péptidos identificados en este invento se pueden usar como herramientas moleculares en los campos tanto de diagnóstico como en terapéuticos. Es bien sabido que los actuales enfoques terapéuticos en la oncología clínica están caracterizados por una baja selectividad. Un agente quimioterapéutico que circula dentro del torrente sanguíneo afecta, aparte de a las masas tumorales, a todas las poblaciones de células del cuerpo que están en proliferación activa. Por el contrario, un péptido que sea reconocido específicamente por unos receptores superficiales específicos para un tipo particular de células será capaz de dirigir a un fármaco quimioterapéutico de manera preferente hacia el objetivo de esa clase de células. Los péptidos descritos en el presente invento se pueden emplear por lo tanto con éxito como agente de dirección de fármacos hacia un objetivo metástasis hepática.

Además, los péptidos marcados con una molécula de detección se pueden usar en el campo del diagnóstico. Actualmente, se usan unas técnicas de detección que permiten la resolución de una lesión metastásica muy precoz a partir de los tejidos circundantes. La tecnología, que se aprovecha del uso de péptidos marcados para la detección de células tumorales, está basada en vez de esto en las diferencias moleculares que distinguen a estas células con respecto de las otras. Los péptidos de acuerdo con el presente invento pueden detectar incluso células individuales de metástasis hepáticas humanas.

Los datos recogidos acerca de los péptidos del presente invento se pueden resumir de la siguiente manera:

- 1) los péptidos seleccionados en la presente solicitud comparten una alta homología de secuencias unos con otros, lo que indica la especificidad de la selección;
- 2) los péptidos del presente invento tienen una alta homología con motivos presentes en proteínas que son específicas para el tejido hepático y/o están relacionadas con patologías neoplásicas;
- 3) a partir de los ensayos de fijación se pone de manifiesto que los péptidos tienen una alta especificidad para moléculas superficiales expuestas en células metastásicas hepáticas humanas, tanto primarias como en cultivo, mientras que ellos no muestran preferentemente ninguna afinidad para células primarias de un hígado normal ni para linajes de células de tumores primarios ni otras clases de metástasis;
- 4) los péptidos del presente invento se fijan universalmente a células de metástasis hepáticas independientemente de la etapa metastásica, de parámetros clínicos o de otras características relacionadas con cada paciente, siendo por lo tanto unas buenas herramientas de pronóstico - diagnóstico y terapéuticas candidatas.

## A. Definiciones

Tal como se usan en el presente contexto en la memoria descriptiva, los artículos “un” o “uno” pueden significar “uno o más”. Como se usa aquí en las reivindicaciones, en conjunción con el término “que comprende”, las palabras “un” o “uno” pueden significar “uno o más de uno”. Como se usa aquí “otro” puede significar por lo menos un segundo objeto o más de un objeto.

### 1. Resto de dirección a un objetivo

Un “resto de dirección a un objetivo” es un término que abarca diversos tipos de reactivos con afinidad, que se pueden usar para acrecentar la localización o la fijación de una sustancia a un sitio particular en un animal, incluyendo órganos, tejidos, tipos de células particulares, tejidos enfermos o tumores. Los restos de dirección a un objetivo pueden incluir péptidos, compuestos miméticos de péptidos, polipéptidos, anticuerpos, moléculas similares a anticuerpos, ácidos nucleicos, aptámeros, y fragmentos de los/las mismos/as. En ciertas formas de realización, un resto de dirección a un objetivo aumentará la localización de una sustancia en células de metástasis hepáticas que son secundarias para un carcinoma de colon, a través de la fijación a una proteína superficial de estas células, es decir a través de la fijación a unas proteínas asociadas con matrices transmembranales o asociadas con una superficie o segregadas o extracelulares. Una fijación selectiva de un resto de dirección a un objetivo del presente invento, p.ej. un péptido o un anticuerpo de dirección a un objetivo, así como variantes y fragmentos de los mismos, se produce cuando el resto de dirección a un objetivo se fija a un objetivo (p.ej. células de la metástasis hepática que es secundaria con respecto a un cáncer de colon) y no se fija significativamente a células no relacionadas. Se considera todavía que un resto de dirección a un objetivo se fija selectivamente incluso aunque también se fije a otras proteínas que no son sustancialmente homólogas con el objetivo, siempre y cuando que tales proteínas compartan una homología con un fragmento o dominio del péptido que es objetivo del anticuerpo. En este caso, se entendería que un resto objetivo que se fija a un objetivo es todavía selectivo a pesar de presentar un cierto grado de reactividad cruzada. Típicamente, el grado de reactividad cruzada se puede determinar y diferenciar con respecto de una fijación al objetivo.

### 2. Péptido de dirección a un objetivo

Un “péptido de dirección a un objetivo” es un péptido que comprende una secuencia contigua de aminoácidos, que está caracterizada por su localización selectiva para un órgano, un tejido o un tipo de células, que incluye una fijación específica con una proteína o molécula extracelular, que es expresada o producida específicamente en un tejido específico o en uno o varios tipo(s) de células.

### 3. Receptor

Un “receptor” para un péptido de dirección a un objetivo incluye, pero no se limita a, cualquier molécula o complejo molecular que se fija a un péptido de dirección a un objetivo. Ejemplos no limitativos de receptores incluyen péptidos, proteínas, glicoproteínas, lipoproteínas, epítomos, lípidos, hidratos de carbono, estructuras multimoleculares, y una conformación específica de una o más moléculas. En unas formas de realización preferidas, un “receptor” es una molécula o un complejo de moléculas que se presentan en la naturaleza, que está presente sobre la superficie luminal de células que forman vasos sanguíneos dentro del objetivo de un órgano, un tejido o un

tipo de células. Más específicamente, un “receptor” es una molécula que se presenta en la naturaleza, que está presente sobre la superficie luminal de unas células que forman vasos sanguíneos dentro del objetivo de un órgano, un tejido o un tipo de células.

#### 4. Residuo de aminoácido

5 Un “residuo de aminoácido” se refiere a cualquier aminoácido natural, cualquier derivado de aminoácido o cualquier compuesto mimético de aminoácido, que se conozca en la especialidad. Los residuos de proteínas son generalmente consecutivos, sin compuestos que no sean de aminoácidos, que interrumpan la secuencia de residuos de aminoácidos. En unas formas de realización particulares, la secuencia de aminoácidos puede incluir uno o más compuestos que no sean de aminoácidos. En unas formas de realización particulares, la secuencia de aminoácidos puede incluir uno o más compuestos que no sean de aminoácidos. En unas formas de realización particulares, la secuencia de un péptido del presente invento puede ser interrumpida por uno o más compuestos que no sean de aminoácidos. Los aminoácidos modificados o no usuales incluyen, pero no se limitan a: Aad, ácido 2-aminoadípico; EtAsn, N-étil-asparagina; Baad, ácido 3-aminoadípico, Hyl, hidroxil-lisina; Bala, beta-alanina, ácido beta-amino-propiónico; AHyl, alo-hidroxi-lisina; Abu, ácido 2-aminobutírico; 3Hyp, 3-hidroxi-prolina; 4-Abu, ácido 4-aminobutírico, ácido piperidínico; 4Hyp, 4-hidroxi-prolina; Acp, ácido 6-aminocaproico, Ide, isodesmosina; Ahe, ácido 2-aminoheptanoico; Alle, alo-isoleucina; Aib, ácido 2-aminoisobutírico; MeGly, N-metil-glicina, sarcosina; Baib, ácido 3-aminoisobutírico; Melle, N-metil-isoleucina; Apm, ácido 2-aminopimélico; MeLys, 6-N-metil-lisina; Dbu, ácido 2,4-diaminobutírico; MeVal, N-metil-valina; Des, desmosina; Nva, norvalina; Dpm, ácido 2,2'-diaminopimélico; Nle, norleucina; Dpr, ácido 2,3-diaminopropiónico; Orn, ornitina; y EtGly, N-étil-glicina. También se incluyen los D-aminoácidos.

#### 5. Proteína o péptido

El término “proteína o péptido” incluye unas secuencias de aminoácidos constituidas por al menos uno de los 20 aminoácidos corrientes que se pueden encontrar en proteínas naturales, o por al menos un aminoácido modificado o no usual.

#### 6. Reactivos de reticulación

Los “reactivos de reticulación” bifuncionales se han usado extensamente para una diversidad de finalidades, incluyendo la preparación de matrices de afinidad, la modificación y estabilización de diversas estructuras, la identificación de ligandos y de sitios de fijación a receptores, y los estudios estructurales. Unos reactivos homobifuncionales, que llevan dos grupos funcionales idénticos, probaron ser altamente eficientes para inducir una reticulación entre macromoléculas o subunidades idénticas o diferentes de una macromolécula, y para engazar unos ligandos polipeptídicos a sus respectivos sitios de fijación. Los reactivos heterobifuncionales contienen dos grupos funcionales diferentes. Aprovechándose de las ventajas de las reactividades diferenciales de los dos grupos funcionales diferentes, una reticulación puede ser controlada de una manera tanto selectiva como secuencial. Los reactivos de reticulación bifuncionales pueden ser divididos de acuerdo con la especificidad de sus grupos funcionales, p.ej., grupos específicos amino, sulfhidrilo, guanidino, indol y carboxilo. De éstos, los reactivos dirigidos hacia grupos amino libres han resultado ser especialmente populares a causa de su disponibilidad comercial, su facilidad de síntesis y las suaves condiciones de reacción bajo las cuales ellos pueden ser aplicados y usados. Una mayoría de los reactivos de reticulación heterobifuncionales contienen un grupo reactivo con aminas primarias y un grupo reactivo con tioles.

#### 7. Anticuerpos

Tal como se usa en el presente contexto, se pretende que el término “anticuerpo” se refiera ampliamente a un agente de fijación inmunológica, tal como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, o una molécula similar a un anticuerpo. Generalmente, se prefieren las IgG y/o IgM, puesto que ellas son los anticuerpos más corrientes en la situación fisiológica y puesto que ellas pueden ser preparadas con facilidad en un ambiente de laboratorio. Unos medios para preparar y caracterizar anticuerpos son asimismo bien conocidos en la especialidad. Se define aquí como “anticuerpo” cualquier molécula similar a un anticuerpo que tenga una región de fijación a antígenos, incluyendo fragmentos de anticuerpos, tales como Fab', Fab, F(ab')<sub>2</sub>, anticuerpos de dominio único (DAB's, de single domain antibodies), Fv, anticuerpos de cadena única (scFv, de single chain antibodies).

#### 8. Ácidos nucleicos

Los “ácidos nucleicos” de acuerdo con el presente invento pueden codificar un péptido de dirección a un objetivo, un anticuerpo de dirección a un objetivo, un polipéptido terapéutico, una proteína de fusión u otra proteína u otro péptido. El ácido nucleico puede derivarse de un ADN genómico, de un ADN complementario (ADNc) o de un ADN sintético. El término “ácido nucleico”, como se usa en el presente contexto, incluye moléculas de una sola hebra y moléculas de dos hebras, así como ADN, ARN, ácidos nucleicos modificados químicamente y compuestos análogos a ácidos nucleicos. Se considera que un ácido nucleico situado dentro del alcance del presente invento puede tener casi cualquier tamaño, determinado en parte por la longitud de la proteína o del péptido que se haya codificado. Se considera que los péptidos de dirección a un objetivo, los anticuerpos de dirección a un objetivo y las



proteínas de fusión se pueden codificar por cualquier secuencia de ácido nucleico que codifique la apropiada secuencia de aminoácidos. El diseño y la producción de ácidos nucleicos que codifican una deseada secuencia de aminoácidos son bien conocidos/as para los que tienen experiencia en la especialidad, usando tablas de codones normalizadas.

## 5 9. Herramientas de suministro

Se pueden usar varias herramientas de suministro para la administración de péptidos objetivos de acuerdo con el presente invento; entre otras, liposomas y sistemas de microemulsiones de los tipos de aceite en agua o de agua en aceite. Los liposomas y las microemulsiones, y otros sistemas de micro-suministro, se pueden preparar por procedimientos bien conocidos en la especialidad. Unos ligandos pueden ser fijados por enlaces covalentes a unos sitios, situados sobre la superficie de liposomas. El número y la densidad superficial de estos sitios que se pueden ajustar empleando unas formulaciones de liposomas y/o unos tipos de liposomas específicas/os. Las superficies de liposomas pueden tener también unos sitios para una asociación no covalente. Para formar conjugados covalentes de ligandos y liposomas, se han estudiado los reactivos de reticulación en cuanto a su efectividad y biocompatibilidad. Los reactivos de reticulación incluyen el aldehído glutárico (GAD), un oxirano bifuncional (OXR), el etilen glicol diglicidil éter (EGDE) y una carbodiimida soluble en agua, preferiblemente 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC).

## B. PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS

### 1. Péptidos

El presente invento implica el uso de un péptido capaz de fijarse selectivamente a células metastásicas, de manera preferible a células metastásicas hepáticas.

En particular, en una forma de realización, el presente invento se dirige a un péptido capaz de fijarse selectivamente a células metastásicas, preferiblemente a células metástasis hepáticas humanas, que tienen el motivo de secuencia LRS, una longitud de 6 a 100 aminoácidos y que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el conjunto que se compone de: ARPGLRS (SEQ ID NO. 1), MRYALRS (SEQ ID NO. 2), LRPGLRS (SEQ ID NO. 3), LRSGSGS (SEQ ID NO. 4), GIYRLRS (SEQ ID NO. 6), GVYSLRS (SEQ ID NO. 7), LRSGRGS (SEQ ID NO. 96), RREGLRS (SEQ ID NO. 110), SWYTLRS (SEQ ID NO. 111), LAYRLRS (SEQ ID NO. 113), LTYRLRS (SEQ ID NO. 115), VRPGLRS (SEQ ID NO. 117) y LRSGRGS (SEQ ID NO. 119). El péptido puede comprender una única copia de una secuencia como se define en las SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 6, 7, 96, 110, 111, 113, 115, 117 y 119 o múltiples copias idénticas o diferentes de dichas secuencias, conectadas opcionalmente por secuencias de engarzadores de aminoácidos.

Debido a su tamaño relativamente pequeño, los péptidos objetivos del presente invento pueden ser sintetizados en el estado de solución o sobre soportes sólidos, de acuerdo con técnicas bien conocidas. Unos péptidos cortos, generalmente con aproximadamente 6 hasta 35-40 aminoácidos, se pueden producir con facilidad mediante estas técnicas. Alternativamente, se puede usar una tecnología de ADNc recombinante, en la que una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido del invento es introducida dentro de un vector de expresión, transformada o transfectada en apropiadas células anfitrionas, y cultivada en condiciones apropiadas para la expresión de proteínas.

Los péptidos del presente invento pueden consistir en residuos de aminoácidos naturales o pueden comprender por lo menos un residuo de aminoácido modificado o no usual. Los péptidos del presente invento pueden ser péptidos lineales o cíclicos. Los péptidos del presente invento tienen una longitud de aproximadamente 6 hasta aproximadamente 100, de manera preferible hasta aproximadamente 35-40 aminoácidos o compuestos miméticos de aminoácidos.

### 2. Compuestos miméticos de péptidos

Otra forma de realización del presente invento implica el uso de "compuestos miméticos de péptidos". Los compuestos miméticos son unos péptidos que contienen unas moléculas que imitan a elementos de la estructura secundaria de las proteínas. La razón que está en la base de los compuestos miméticos de péptidos se encuentra en el hecho de que el esqueleto de péptido de la proteína tiene principalmente la función de orientar las cadenas laterales de los aminoácidos, con el fin de favorecer las interacciones moleculares, tales como las de los anticuerpos y los antígenos. Un compuesto mimético de péptido permite las interacciones moleculares de una manera igual a como en la molécula natural. Estos principios pueden ser aprovechados para producir por ingeniería genética unas moléculas de segunda generación, que tienen la mayor parte de las propiedades naturales de los péptidos objetivos que se describen en el presente invento, pero con unas características modificadas y posiblemente mejoradas. Un ejemplo de compuestos miméticos de péptidos es un péptido retroinvertido, formado por D-aminoácidos en una secuencia invertida en comparación con la secuencia de péptidos que ella imita. Los compuestos miméticos de péptidos del presente invento tienen una longitud de 6 hasta aproximadamente 100, de manera preferible hasta aproximadamente 35-40 aminoácidos o compuestos miméticos de aminoácidos.

### 3. Proteínas de fusión

Los péptidos del presente invento se pueden usar también como uno de los componentes de una proteína de fusión.

5 Las proteínas de fusión comprenden la secuencia entera o una parte del péptido objetivo fusionado junto a su extremo de N y/o C opcionalmente a través de un engarzador peptídico a un(a) segundo(a) polipéptido o proteína, que es heterólogo/a con el péptido objetivo. Por ejemplo, las proteínas de fusión pueden comprender unas secuencias de señal de otras proteínas, para permitir la expresión de proteínas recombinantes en un anfitrión heterólogo. Otras útiles proteínas de fusión comprenden un dominio activo inmunológicamente, tal como un epítipo de anticuerpo, para facilitar la purificación de la proteína de fusión. La incorporación de un sitio de disociación, p.ej. de un sitio de disociación proteolítica, junto al sitio de fusión o en la inmediata vecindad respecto de éste, favorecerá la retirada del dominio exógeno después de una purificación. Otras útiles proteínas de fusión comprenden unos dominios funcionales, tales como sitios activos de enzimas, dominios de glicosilación, señales de dirección hacia células, o regiones transmembranales.

15 En una forma de realización del presente invento, las proteínas de fusión son producidas por unos péptidos objetivos fusionados con una proteína o con un péptido con actividad terapéutica. Ejemplos de proteínas o péptidos, que se pueden incorporar en una proteína de fusión, incluyen: proteínas citostáticas, proteínas citotóxicas, agentes pro-apoptóticos, agentes anti-angiogénicos, hormonas, citocinas, factores de crecimiento, fármacos peptídicos, anticuerpos, fragmentos Fab de anticuerpos, antígenos, proteínas de receptores, enzimas, lectinas, proteínas del complejo de histocompatibilidad mayor, proteínas de adhesión a células y proteínas de fijación. No se pretende que tales ejemplos sean limitativos, pero se entiende que, de acuerdo con el presente invento, virtualmente cualquier proteína o péptido se puede incorporar en una proteína de fusión que incluye un péptido objetivo. Los métodos para producir proteínas de fusión son bien conocidos. Tales proteínas se pueden producir, por ejemplo, por combinación química usando reactivos de reticulación bifuncionales, por una síntesis de novo de toda la proteína de fusión, o por adosamiento de una secuencia de ADN que codifica el péptido objetivo a una secuencia de ADN que codifica la segunda proteína o el segundo péptido, seguida por la expresión de toda la proteína de fusión.

### 4. Anticuerpos

En una forma diferente de realización del presente invento, puede ser deseable producir unos anticuerpos contra los péptidos objetivos que son objeto del presente invento.

30 Para esta finalidad, los péptidos objetivos, o las moléculas a las que ellos se fijan, se pueden acoplar, fijar, conjugar o engazar químicamente a uno a más agentes por medio de elementos espaciadores, elementos poli-espaciadores, o aminoácidos derivatizados para producir un complejo que comprende por lo menos un péptido o una molécula objetivo que se fija a un péptido objetivo. Esto se puede hacer de una manera tal que se produzca un complejo bi- o multivalente, o una vacuna. Los métodos para producir tales complejos son familiares para los expertos en la especialidad y se pueden adaptar a una administración a un ser humano, es decir pueden ser farmacológicamente aceptables. Los agentes preferidos son vehículos, tales como hemocianina (KLH) y albúmina de suero bovino (BSA). Los anticuerpos resultantes se pueden usar tanto para el diagnóstico como para la terapia, por ejemplo por fijación y/o inhibición de proteínas funcionales sobre la superficie de células metastásicas.

40 Con el fin de mejorar la eficiencia de las moléculas de anticuerpos, ellas pueden ser fijadas o convertidas en un complejo con por lo menos un sistema o una molécula, por ejemplo una molécula que permite su detección. Ejemplos no limitativos de tales moléculas incluyen enzimas, radionúclidos, aptámeros, marcas fluorescentes, moléculas fosforescentes, moléculas quimioluminiscentes, cromóforos, moléculas luminiscentes, partículas coloreadas o ligandos tales como biotina.

### C. CONJUGADOS DIAGNÓSTICOS Y TERAPÉUTICOS

45 En una forma de realización del presente invento, puede ser deseable acoplar unos específicos agentes bioactivos a uno o más péptidos objetivos de acuerdo con el presente invento para la liberación específica dentro de un órgano, un tejido o un tipo de células. A continuación, se indican algunos ejemplos de agentes que pueden ser acoplados a péptidos objetivos de acuerdo con el presente invento.

50 Los conjugados de acuerdo con el presente invento se pueden producir por conjugación directa del péptido objetivo al agente terapéutico o de diagnóstico que interesa, o usando unos reactivos de reticulación para establecer unión o fijación entre un péptido y la molécula que interesa.

#### 1. Citocinas

55 El término "citocina" es un término genérico para unas proteínas liberadas por una población de células, que actúa sobre otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de dichas citocinas son linfocinas, monocinas, factores de crecimiento y hormonas polipeptídicas tradicionales. Se incluyen entre las citocinas las hormonas de crecimiento, tales como una hormona de crecimiento humana, una N-metionil hormona de crecimiento humana, y una hormona de crecimiento bovina; una hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina;

5 hormonas glicoproteínicas tales como la hormona estimuladora de los folículos (FSH, acrónimo de follicle stimulating hormone), hormona estimuladora de la tiroides (TSH, acrónimo de thyroid stimulating hormone) y la hormona luteinizante (LH, acrónimo de luteinizing hormone); el factor de crecimiento hepático; una prostaglandina; el factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; la proteína OB; los factores alfa y beta de necrosis de tumores; la sustancia inhibidora mulleriana; un péptido asociado con la gonadotropina de ratón; inhibina; activina; el factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nerviosos tales como el NGF-beta; factores de crecimiento plaquetarios; factores de crecimiento transformantes (TGF's) tal como el TGF-alfa y el TGF-beta; factores de crecimiento I y II similares a insulina; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones tales como los interferones-alfa, -beta y -gamma; factores estimulantes de colonias (CSF's) tales como el CSF de macrófagos (M-CSF); el CSF de granulocitos-macrófagos (GM-CSF); y el CSF de granulocitos (G-CSF); interleucinas (IL's) tales como las IL-1, IL-1alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, LIF, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, EPO, ligando de kit (estuche) o FLT-3, angiostatina, tromboespondina, endostatina, factores de necrosis de tumores y LT. Tal como se usa en el presente contexto, el término "citocina" incluye proteínas procedentes de fuentes naturales o procedentes de un cultivo de células recombinantes, y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencias naturales.

## 2. Quimiocinas

20 Las "quimiocinas" actúan generalmente como agentes quimioatrayentes con el fin de reclutar células efectoras inmunitarias para el sitio de expresión de quimiocinas. Puede ser ventajoso expresar un gen particular de quimiocinas en combinación, con, por ejemplo un gen de citocinas, con el fin de intensificar el reclutamiento de otros componentes del sistema inmunitario para el sitio de tratamiento. Las quimiocinas incluyen, pero no se limitan a, RANTES, MCAF, MIP1-alfa, MIP1-beta e IP-10. El profesional experto reconocerá que se sabe también que ciertas citocinas tienen efectos quimioatrayentes y se podrían clasificar también dentro del término de "quimiocinas".

## 3. Agentes de representación en imágenes

25 En ciertas formas de realización, las moléculas de dirección a un objetivo del presente invento se pueden unir con agentes de representación en imágenes, aptos para usarse para representar en imágenes y diagnosticar metástasis hepáticas.

30 Son bien conocidos varios agentes de representación en imágenes, igual a como lo son los métodos para fijarlos a proteínas o péptidos. Ejemplos no limitativos de agentes de reproducción en imágenes incluyen iones paramagnéticos tales como los de cromo (III), manganeso (II), hierro (III), hierro (II), cobalto (II), níquel (II), cobre (II), neodimio (III), samario (III), iterbio (III), gadolinio (III), vanadio (II), terbio (III), disprosio (III), holmio (III) y erbio (III), siendo particularmente preferido el de gadolinio. Los iones que son útiles otros contextos, tal como en la reproducción en imágenes por rayos X, incluyen, pero no se limitan a, lantano (III), oro (III), plomo (II) y especialmente bismuto (III).

35 Los radioisótopos aptos para usarse como agentes de reproducción en imágenes o terapéuticos incluyen <sup>211</sup>astatina, <sup>14</sup>carbono, <sup>51</sup>cromo, <sup>36</sup>cloro, <sup>57</sup>cobalto, <sup>58</sup>cobalto, <sup>67</sup>cobre, <sup>152</sup>Eu (europio), <sup>67</sup>galio, <sup>3</sup>hidrógeno, <sup>123</sup>yodo, <sup>125</sup>yodo, <sup>131</sup>yodo, <sup>111</sup>indio, <sup>59</sup>hierro, <sup>32</sup>fósforo, <sup>186</sup>renio, <sup>188</sup>renio, <sup>75</sup>selenio, <sup>35</sup>azufre, <sup>99m</sup>tecnecio y <sup>90</sup>itrio.

40 En ciertas formas de realización, las proteínas o los péptidos que se reivindican se pueden engarzar a un ligando de fijación secundaria o a una enzima (una marca o etiqueta de enzima) que generará un producto coloreado al entrar en contacto con un sustrato cromógeno. Ejemplos de enzimas apropiadas incluyen ureasa, fosfatasa alcalina, hidrógeno peroxidasa (de rábano picante) y glucosa oxidasa. Unos preferidos ligandos de fijación secundaria son biotina y avidina o compuestos de estreptavidina. El uso de tales marcas o etiquetas es bien conocido para los que tienen experiencia en la especialidad.

45 En todavía otras formas de realización adicionales, un resto de dirección a un objetivo puede ser acoplado operativamente a una nanopartícula. Las nanopartículas incluyen, pero no se limitan a, nanopartículas coloidales de oro y de plata. Las nanopartículas exhiben ciertos colores en la región espectral visible. Otros ejemplos adicionales de nanopartículas son las nanopartículas magnéticas.

## 4. Agentes terapéuticos

50 En ciertas formas de realización, los agentes terapéuticos pueden ser acoplados operativamente a un péptido o a una proteína de fusión de dirección a un objetivo para un suministro selectivo a, por ejemplo, la vasculatura tumoral de las metástasis hepáticas. Unos agentes o factores apropiados para usarse pueden incluir cualquier compuesto químico que induzca una apoptosis, una muerte celular, una estasis celular y/o una anti-angiogénesis, tales como

55 - Agentes reguladores de la muerte celular programada o apoptosis. La proteína Bcl-2 y otros miembros de la familia están implicada/os en una apoptosis, y se pueden clasificar como agentes agonistas o antagonistas de la apoptosis. Por ejemplo, el Bcl-2 y otros miembros de la familia (p.ej., Bcl-XL, Bcl-W, Bcl-

S, Mcl-1, A1, Bfl-1) son pro-apoptóticos, mientras que otros (p.ej. Bax, Bak, Bik, Bim, Bid, Bad, Harakiri) son anti-apoptóticos.

5 - Agentes inhibidores de la angiogénesis. En ciertas formas de realización el presente invento puede concernir a la administración de moléculas de dirección a un objetivo, que están acopladas operativamente con agentes anti-angiogénicos, tales como angiostensina, péptidos de laminina, péptidos de fibronectina, agentes inhibidores del activador de plasminógeno, agentes inhibidores de la metaloproteinasa de tejidos, interferones, interleucina 12, el factor de plaquetas 4, IP-10, tromboespondina, 2-metoxiestradiol, la proteína relacionada con proliferina, carboxiamidotriazol, CM101, marimastat, polisulfato de pentosán, angiopoyetina 2 (regenerona), interferón-alfa, herbimicina A, PNU1451565E, un fragmento de prolactina de 16K, linomida, talidomida, pentoxifilina, genisteína, TNP-470, endostatina, paclitaxel, accutin, angiostatina, cidofovir, vincristina, bleomicina, AGM-1470, el factor de plaquetas 4 o minociclina.

10 - Agentes citotóxicos. Los agentes quimioterapéuticos (citotóxicos) se pueden usar para tratar diversos estados patológicos de enfermedad, incluyendo un cáncer. La mayor parte de los agentes quimioterapéuticos entran dentro de las categorías de agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, hormonas corticosteroides, agentes inhibidores mitóticos, y nitrosoureas, agentes hormonales, agentes diversos y cualquier compuesto análogo o derivado variante de los mismos.

15 - Agentes alquilantes. Los agentes alquilantes son unos fármacos que interactúan directamente con un ADN genómico para impedir que las células proliferen. Esta categoría de fármacos quimioterapéuticos representa a unos agentes que afectan a todas las fases del ciclo celular, es decir que ellos no son específicos para ciertas fases. Un agente alquilante puede incluir, pero no está limitado a, una mostaza nitrogenada, una etilenimina, una metil-melamina, un alquil sulfonato, una nitroso-urea o una triazina. Ellos incluyen, pero no se limitan a: busulfano, clorambucil, cisplatino, ciclofosfamida (citoxano), dacarbazina, ifosfamida, mecloretamina (mustargen) y melfalán.

20 - Antimetabolitos. Los antimetabolitos interrumpen la síntesis de los ADN y ARN. A diferencia de los agentes alquilantes, ellos influyen específicamente sobre el ciclo celular durante la fase S. Los antimetabolitos pueden ser diferenciados en diversas categorías, tales como compuestos análogos al ácido fólico, compuestos análogos a pirimidina y compuestos análogos a purina, y compuestos inhibidores afines. Los antimetabolitos incluyen, pero no se limitan a, 5-fluorouracilo (5-FU), citarabina (Ara-C), fludarabina, gencitabina y metotrexato.

25 - Productos naturales. Los productos naturales se refieren generalmente a unos compuestos aislados originalmente a partir de una fuente natural, e identificados como poseedores de una actividad farmacológica. Tales compuestos, compuestos análogos y derivados de los mismos pueden ser aislados a partir de una fuente natural, sintetizados por vía química, o producidos de manera recombinante por cualquier técnica conocida para los que poseen experiencia en la especialidad. Los productos naturales incluyen unas categorías tales como agentes inhibidores mitóticos, agentes antibióticos antitumorales, enzimas y agentes modificadores de la respuesta biológica.

30 - Agentes inhibidores mitóticos. Los agentes inhibidores mitóticos incluyen alcaloides vegetales y otros agentes naturales que pueden inhibir a cualquiera de las síntesis de proteínas que se requieren para una división celular o mitosis. Ellos trabajan durante una fase específica durante el ciclo celular. Los agentes inhibidores mitóticos incluyen, por ejemplo, docetaxel, etoposido (VP16), teniposido, paclitaxel, taxol, vinblastina, vincristina y vinorelbina. Los taxoides son una clase de compuestos afines aislados a partir de la corteza del fresno, *Taxus brevifolia*. Los taxoides incluyen, pero no se limitan a, compuestos tales como docetaxel y paclitaxel. El paclitaxel se fija a la tubulina (en un sitio distinto del usado por los alcaloides de vinca) y favorece el ensamble de los microtúbulos. Los alcaloides de vinca son un tipo de alcaloide vegetal identificado por tener una actividad farmacéutica. Ellos incluyen unos compuestos tales como vinblastina (VLB) y vincristina.

35 - Antibióticos. Es bien conocido que ciertos antibióticos tienen una actividad tanto antimicrobiana como citotóxica. Estos fármacos interfieren también con un ADN inhibiendo químicamente a las enzimas y a la mitosis o alterando a membranas celulares. Estos agentes no son específicos de ciertas fases, por lo que ellos trabajan en todas las fases del ciclo celular. Ejemplos de antibióticos citotóxicos incluyen, pero no se limitan a bleomicina, dactinomicina, daunorrubicina, doxorrubicina (adriamicina), plicamicina (mitramicina) e idarrubicina.

40 - Agentes citotóxicos diversos. Los agentes citotóxicos diversos que caen dentro de las categorías anteriores incluyen, pero no se limitan a, compuestos complejos de coordinación con platino, antracenedionas, ureas sustituidas, derivados de metil hidrazina, amsacrina, L-asparaginasa, y tretinoína. Los compuestos complejos de coordinación con platino incluyen unos compuestos tales como carboplatino y cisplatino (cis-DDP). Una antracenediona ilustrativa es mixantrona. Una urea sustituida ilustrativa es la hidroxil-urea. Un derivado ilustrativo de metil hidrazina es la procarbazona (N-metil-hidrazina, MIH). Estos ejemplos no son limitativos y se considera que cualquier agente citotóxico, citostático o citocida puede ser

adosado a péptidos de dirección a un objetivo y administrados a un órgano, tejido o tipo de célula que se haya establecido como objetivo dentro del alcance del invento.

#### D. ÁCIDOS NUCLEICOS

5 El presente invento está dirigido adicionalmente a un ácido nucleico que codifica un péptido capaz de fijarse selectivamente a células metastásicas, que tiene el motivo de secuencia LRS, una longitud de 6 a 100 aminoácidos de secuencia y comprende por lo menos una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el conjunto que se compone de: ARPGLRS (SEQ ID NO. 1), MRYALRS (SEQ ID NO. 2), LRPGLRS (SEQ ID NO. 3), LRSGSGS (SEQ ID NO. 4), GIYRLRS (SEQ ID NO. 6), GVYSLRS (SEQ ID NO. 7), LRSGRGS (SEQ ID NO. 96), RREGLRS (SEQ ID NO. 110), SWYTLRS (SEQ ID NO. 111), LAYRLRS (SEQ ID NO. 113), LTYRLRS (SEQ ID NO. 115), VRPGLRS (SEQ ID NO. 117) y LRSGRGS (SEQ ID NO. 119).

Los ácidos nucleicos de acuerdo con el presente invento pueden codificar un péptido objetivo, un anticuerpo objetivo, un polipéptido terapéutico, una proteína de fusión u otras/os proteínas u péptidos. El ácido nucleico se puede seleccionar entre un ADN genómico, un ADN complementario (ADNc) y un ADN o ARN sintético.

15 En una forma de realización, el presente invento implica el uso de unos vectores que expresan un péptido de acuerdo con el presente invento para una terapia génica.

Los vectores para una terapia génica pueden incluir diversos transgenes, incluyendo una secuencia de ADN o ARN que codifica por lo menos un péptido o polipéptido del presente invento, engarzado operativamente a secuencias de control de la expresión.

20 Una terapia génica se puede usar para expresar un gen terapéutico, por ejemplo para intensificar o disminuir la neo-vascularización. Un ADN puede estar en forma de un ADNc, un ADN polimerizado in vitro, un ADN de plásmido, partes de un ADN de plásmido, un material genético derivado de un virus, un ADN lineal, vectores (P1, PAC, BAC, YAC, cromosomas artificiales), casetes de expresión, secuencias quiméricas, un ADN recombinante, un ADN cromosomal, un oligonucleótido, un ADN antisentido, o derivados de estos conjuntos. Un ARN puede estar en la forma de un ARN de oligonucleótidos, un ARNt (ARN de transferencia), un ARNsn (ARN nuclear pequeño), un ARNr (ARN ribosómico), un ARNm (ARN mensajero), un ARN polimerizado in vitro, un ARN recombinante, secuencias quiméricas, un ARN antisentido, un ARNsi (un ARN interferente pequeño), ribozimas, o derivados de estos conjuntos. Un polinucleótido antisentido es un polinucleótido que interfiere con la función de un ADN y/o ARN. Los polinucleótidos antisentido incluyen, pero no se limitan a: morfolinos, 2'-O-metil polinucleótidos, ADN, ARN y similares. Un ARNsi comprende una estructura de doble hebra, que típicamente contiene 15-50 pares de bases y preferiblemente 21-25 pares de bases y que tienen una secuencia de nucleótidos que es idéntica o casi idéntica a la de un gen o ARN objetivo expresado dentro de la célula. Una interferencia puede dar como resultado una supresión de la expresión. El polinucleótido puede ser también una secuencia cuya presencia o expresión en una célula altera la expresión o la función de genes o ARN celulares. Además, los ADN y ARN pueden ser de una sola hebra, de doble hebra, de triple hebra o de cuádruple hebra.

#### 35 MATERIALES Y MÉTODOS

##### La metodología de presentación en fagos

40 La presentación en fagos es una técnica desarrollada en la mitad de la década de los años 80 por George Smith de la universidad de Missouri. El principio consiste en seleccionar unos péptidos a partir de una colección, o de una biblioteca, en la que se representan virtualmente todas las permutaciones de aminoácidos que son posibles. Dichos péptidos se seleccionan basándose en su capacidad para fijar específicamente un objetivo de cualquier naturaleza y complejidad que se considere. La metodología de presentación en fagos implica rondas de escrutinio y amplificación de partículas fijadas, con la meta de obtener una reducción en la diversidad y un aumento en la especificidad para fijación.

45 La construcción de una biblioteca de fagos implica el uso de bacteriófagos filamentosos M13 que pueden infectar a bacterias Escherichia coli. Una característica peculiar de estos fagos es de la tener un genoma de ADN circular de una sola hebra, que puede ser manipulado con las técnicas de la biología molecular. En tal biblioteca, los péptidos se derivan de la transcripción y de la traducción de oligonucleótidos exógenos aleatorios, que son clonados dentro del ADN vírico situado corriente arriba desde el gen para la proteína cápsida pIII. Las bacterias son transformadas con estas construcciones artificiales por electroporación; así, ellas producirán una población de fagos recombinantes, cada uno de los cuales incluirá un diferente péptido en forma de una fusión con la proteína pIII. Con este sistema, es posible producir una biblioteca con una diversidad de aproximadamente  $10^6$ - $10^8$  péptidos, en los cuales cada secuencia está representada hasta 100-1.000 veces. Si la degeneración de la secuencia es completa ( $X_n$ , en que X es = cualquier aminoácido y n es el número de los aminoácidos), cada uno de los 20 aminoácidos tiene la misma probabilidad teórica de ser incluido dentro de la secuencia. Otra posibilidad es la de establecer posiciones fijas para un aminoácido. Las bibliotecas se caracterizan frecuentemente por unas cisteínas situadas en posiciones preferentes, junto a ambos extremos del péptido o intercaladas dentro de los residuos aleatorios, entre

los cuales se forman unos puentes de disulfuro intermoleculares que convierten en circular al péptido. La circularización del inserto permite una mejor exposición de la secuencia.

#### Abreviaturas y soluciones

	AEC	3-amino-9-etil carbazol
5	Amp	ampicilina
	BSA	albúmina de suero bovino
	DMEM	medio esencial mínimo de Dulbecco
	DMEM/FCS/HEPES	mezcla de DMEM con un alto contenido de glucosa/2 % de FCS/ 20 mM HEPES
10	DMSO	dimetilsulfóxido
	DTT	ditiotreitól
	DTA	ácido etilen diamino tetraacético
	FCS	suero de ternero fetal
	GST	glutación sulfo-transferasa
15	HEPES	ácido N-2-hidroxi etil piperazino-N'-2-etil sulfónico
	HRP	peroxidasa de rábano picante
	Kan	kanamicina
	IPTG	isopropil-β-tio galactósido
	LB	caldo de Luria Bertani
20	PAF	paraformaldehído
	PBS	solución salina tamponada con fosfato, 150 mM de NaCl, 10 mM de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , de pH 7,40.
	PEG/NaCl	20 % de poli etilen glicol-8.000, 4 M de NaCl
	PMSF	fluoruro de metil sulfonilo
25	SDS	dodecil sulfato de sodio
	TAE	40 mM de Tris-HCl, 0,12 % de ácido acético, 1 mM de EDTA
	Tampón A	50 mM de Tris-HCl, pH 7,40, 150 mM de NaCl, 5% de glicerol, 2 mM de DTT
	Tampón H	10 M de Tris-HCl, pH 7,40, 10 mM de NaCl, 10 mM de PMSF
30	TBS	solución salina tamponada con Tris, 150 mM de NaCl, 2,8 mM de KCl, 25 Mm de Tris base, de pH 7,40
	TBS-T	TBS-0,1%, Tween-20
	TB	caldo terrífico
	Tet	tetraciclina
35	TE	10 mM de Tris-HCl, 1 mM EDTA

#### Reactivos

Material plástico desechable: Falcon, Eppendorf.

Medios y otros reactivos para cultivo de células: DMEM con alto contenido de glucosa y RPMI-1640: de Sigma; DMEM y F12 de Ham: de Biowhittaker Europe; FCS: de Gibco; colagenasa: de Roche; L-glutamina y solución de penicilina/estreptomina: de Biowhittaker Europe; caldos y antibióticos para cultivos de bacterias: LB: de Sigma; TB: de Gibco; Kan y Tet: de Sigma; reactivos para inmunohistoquímica: de DAKO Cytomation.

Muestras quirúrgicas

5 Las muestras quirúrgicas se derivan de pacientes sometidos a operaciones quirúrgicas del Institute for Cancer Research and Treatment (IRCC Instituto para la Búsqueda y el Tratamiento del Cáncer), Candiolo (TO), Italia, División de Cirugía Oncológica. El consentimiento por escrito para la participación en este estudio se obtuvo a partir de todos los donantes.

10 Para cada paciente se obtuvo una muestra de un hígado normal y de una metástasis hepática. Las muestras eran diferentes morfológicamente en cuanto al tamaño, el aspecto, el color, la vascularización, la presencia de regiones necróticas, y la acumulación de conglomerados de lípidos (que es un índice del grado de degeneración inducida por una esteatosis). Las diferencias en los tejidos se relacionan con la diferente fase de progresión de la enfermedad, con el sitio de metastatización del tumor primario, con otras causas o enfermedades eventuales que hubieran ocurrido en el proceso patogénico, o con otras razones relacionadas con una variabilidad individual.

15 Las muestras fueron elaboradas inmediatamente después de una extracción quirúrgica, con el fin de disgregar los tejidos y extraer las células individuales, en las cuales se habían de realizar los experimentos. Todas las manipulaciones fueron realizadas bajo un flujo laminar en condiciones de esterilidad. Las muestras fueron cortadas y picadas con un escalpelo en un pequeño volumen de una PBS. La suspensión, recogida en una PBS, fue centrifugada durante 3 minutos a 100 rpm (revoluciones por minuto) a la temperatura ambiente y el sedimento se volvió a suspender en 5 ml de la colagenasa (al 0,25 % en peso/volumen en DMEM). La digestión de los fragmentos de tejidos se realizó incubando esta suspensión durante 2 horas a 37°C mientras que se agitaba. La muestra fue centrifugada de nuevo, con el fin de eliminar la totalidad de las partículas con un tamaño situado por debajo del de las células (conglomerados de lípidos, porciones celulares) o también células más pequeñas, de origen hematopoyético. El sedimento fue lavado dos veces en una PBS. Las células se filtraron en unos filtros que tenían un diámetro de 45 µm, se recontaron en una cámara de Bürker y se volvieron a suspender a una concentración de 10<sup>6</sup>/ml en una mezcla de DMEM/FCS/HEPES.

25 En el examen microscópico, después de una disgregación de los tejidos y de una purificación de las células, la población celular primaria apareció como heterogénea y se podrían distinguir otros tipos de células distintos de los hepatocitos y de las células tumorales. Entre éstas, se encuentran las células sanguíneas rojas (glóbulos rojos) y otras células de origen hematopoyético; los fibroblastos derivados de las estructuras conectivas del parénquima; las células endoteliales que revisten a los vasos sanguíneos del tejido analizado.

Linajes celulares

30 Para los experimentos del presente invento se usaron los linajes celulares humanos indicados en la Tabla 1.

Tabla 1

Linaje celular	Descripción
SW480	Cáncer colorrectal primario (ATCC CCL228)
SW620	Metástasis de nódulos linfáticos procedente de un cáncer colorrectal (ATCC CCL227)
NCI-H630	Metástasis hepática procedente de un cáncer colorrectal (ATCC CRL5833)
HepG2	Cáncer hepático primario (ATCC HB8065)
AGS	Cáncer de estómago primario (ATCC CRL1739)
NCI-H87	Metástasis hepática procedente de un cáncer de estómago (ATCC CRL5822)
Capan 2	Cáncer de páncreas primario (ATCC HTB80)
Capan 1	Metástasis hepática procedente de un cáncer de páncreas (ATCC HTB79)
BT-474	Cáncer de mama primario (ATCC HTB20)
MCF-7	Efusión pleural procedente de un cáncer de mama (ATCC HTB22)
A549	Cáncer de pulmón primario (ATCC CCL185)
NCI-H1688	Metástasis hepática procedente de un cáncer de pulmón (ATCC CCL257)

Medios para el cultivo de células

Para el mantenimiento y el crecimiento de linajes celulares se usaron diferentes medios de cultivo, dependiendo del tipo de células:

- 5
- las células SW480, SW620, HepG2, BT-474 y MCF-7 fueron cultivadas en un DMEM, con 10 % de FCS, 20 mM de HEPES, L-glutamina (40 mM), penicilina (200 U/ml) y estreptomycin (200 µg/ml).
  - las células NIC-H630, NCI-H87, NCI-H1688, Capan-1 y Capan-2 fueron cultivadas en el RPMI-1640, con 10 % FCS, L-glutamina (40 mM), penicilina (200 U/ml), y estreptomycin (200 µg/ml).
  - las células A549 y AGS fueron cultivadas en el F12 de Ham, con 10 % de FCS,
- 10 L- glutamina (40 mM), penicilina (200 U/ml) y estreptomycin (200 µg/ml).

Cultivos de células

- 15 Los cultivos se comenzaron a partir de células almacenadas en nitrógeno líquido en una solución de FCS con 10 % de DMSO. Las células, después de una rápida descongelación a 37°C, se cultivaron en platos de 100x20 mm, en una incubadora humidificada a 37°C con 5 % de CO<sub>2</sub>. El reemplazo completo del medio de cultivo se hizo cada 3-4 días. Cuando se alcanzó una confluencia de 80-90 %, las células se lavaron en una PBS y se separaron por incubación con una solución de 0,05 % de tripsina y 2 mM de EDTA a 37°C durante 3 minutos. Un volumen en exceso del medio con 10 % de FCS se añadió luego y las células se recogieron por precipitación a 1.000 rpm durante 3 minutos. El material sobrenadante se retiró, el sedimento se volvió a suspender y se repartió en partes alícuotas en 4 nuevos platos.

- 20 Para los experimentos de presentación en fagos, las células se lavaron en una PBS con 10 mM de EDTA, y se incubaron en la misma solución durante 3 minutos a 37°C. Luego la suspensión de células se cosechó en una PBS en un volumen total de 10 ml. Después de un recuento en la cámara de Bürker, las células se volvieron a suspender en una mezcla de DMEM/FCS/HEPES con una concentración final de  $1 \times 10^6$ /ml.

Bibliotecas de fagos

- 25 Para los experimentos de presentación en fagos se usaron dos bibliotecas cíclicas de los tipos CX<sub>7</sub>C y CX<sub>3</sub>CX<sub>3</sub>CX<sub>3</sub>C y una biblioteca lineal del tipo CX<sub>9</sub>. En estas bibliotecas el inserto se expresa en 5 copias idénticas como un péptido de fusión junto al extremo terminal de N de la proteína pIII. La cisteína del inserto, cercana a la superficie de la cápsida, se fija covalentemente a la proteína de fago y, en el caso de la biblioteca CX<sub>7</sub>C, puede formar un enlace de disulfuro con la cisteína en el lado opuesto. Como consecuencia de esto, el péptido es ciclizado.
- 30 En la biblioteca CX<sub>3</sub>CX<sub>3</sub>CX<sub>3</sub>C, en vez de esto, se pueden formar diferentes combinaciones de puentes de disulfuro, que conducen a múltiples ciclizaciones y a la exposición de motivos de tripéptidos.

La biblioteca CX<sub>9</sub> es lineal y no hay ninguna ciclización, excepto en un caso en el que el último aminoácido es una cisteína, asimismo. Las bibliotecas de fago se conservan a 4°C en TBS, en una concentración de  $10^{10}$ - $10^{12}$  UT/ml.

- 35 Caldos y placas para cultivos de bacterias

LB: este medio fue suplementado o bien con Kan, hasta una concentración final de 20 µg/ml, para la amplificación de la cepa K91kan de la bacteria Escherichia coli, o tanto con Kan como con Tet, ambos a razón de 20 µg/ml, para la amplificación de bacterias después de la infección.

- 40 TB: este caldo se usó para hacer a las bacterias K91kan competentes para una infección, y fue suplementado con Kan, hasta una concentración final de 20 µg/ml.

Placas: las bacterias fueron amplificadas en placas de Petri sobre un substrato semi-sólido, que se componía de la siguiente manera: LB con 15% en peso/volumen de un agar bacteriológico, y Kan (20 µg/ml) para el crecimiento de K91kan, o Kan (20 µg/ml) y Tet (40 µg/ml) para el crecimiento de las bacterias infectadas.

Selección de bibliotecas en las células

- 45 Para todos los procesos con respecto a la presentación en fagos, se usaron los protocolos conocidos en la bibliografía. En particular, el protocolo para la separación total de las células por adsorción se deriva de unos métodos descritos, pero fue adaptado al sistema en análisis, después de varios ensayos, con la meta de optimizar la aplicación.



Primera ronda. Un microlitro de la biblioteca se incubó con  $5 \times 10^5$  células metastásicas recientemente recogidas, en un volumen total de 500  $\mu$ l en una mezcla de DMEM/FCS/HEPES, durante 16 horas a 4°C, con suave agitación. Se realizaron luego cuatro lavados en el mismo medio con el fin de eliminar los fagos débilmente fijados o los fagos que se han dejado en solución. Los lavados se realizaron en 1 ml del mismo medio.

5 Rondas sucesivas. En las sucesivas rondas de selección, 50  $\mu$ l de los fagos obtenidos a partir de la ronda I se incubaron con  $5 \times 10^5$  células de un hígado normal procedente del mismo paciente en 500  $\mu$ l de una mezcla de DMEM/FCS/HEPES. Esta operación de preselección negativa duró 1 hora a la temperatura ambiente mediando suave agitación, y se repitió dos veces. Luego el material sobrenadante se dividió en dos partes, que fueron añadidas a  $5 \times 10^5$  células, tomadas de células o bien procedentes del hígado normal o de una metástasis hepática, respectivamente. Las dos suspensiones de células se incubaron durante 2 horas a 4°C mediando suave agitación. Siguieron unos lavados, como se han descrito. Los fagos fijados fueron recogidos infectando bacterias competentes.

Infección de las bacterias y amplificación de los fagos

15 Las bacterias se hicieron crecer en 10 ml de un TB con Kan, a 37°C mientras que se agitaba durante 2-3 horas, hasta que ellas alcanzaron la densidad óptica de 1,5-2,0 a la longitud de onda de 600 nm. Luego, 1 mililitro de bacterias competentes se añadió a los 100  $\mu$ l de la suspensión de células, después de haber lavado. La infección duró 1 hora a la temperatura ambiente. Al final de la incubación, una parte de las bacterias se extendieron, en duplicado, sobre placas de Petri con un agar LB y con Tet, y se incubaron durante 16 horas a 37°C. Este sistema permite crecer solamente a las bacterias infectadas con fagos, puesto que solamente los fagos llevan la resistencia a este antibiótico. Las UT (unidades de titulación o valoración) relacionadas con el fago de sustrato fijado se evaluaron recontando las colonias de cada placa. Aquí, nosotros nos referimos a este valor con el término "salida".

20 La parte remanente de las bacterias se añadió a 10 ml de un LB con Tet y Kan y se hicieron crecer durante 16 horas a 37°C mientras que se agitaba.

Purificación de fagos

25 Este proceso se usó para purificar a ambas poblaciones de fagos que se derivaban de las rondas de selección y de los clones de un único fago. El cultivo de bacterias se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 minutos a 4°C para eliminar las bacterias. Los fagos, que ahora estaban en el material sobrenadante, fueron precipitados con 0,15 volúmenes de una mezcla de PEG/NaCl durante 1 hora a 4°C y recogidos por centrifugación a 6.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Después de haber decantado el material sobrenadante, el sedimento fue compactado centrifugando adicionalmente a 6.000 rpm durante 5 minutos a 4°C y luego fueron vueltos a suspender, mediante agitación durante 10 minutos, en 500  $\mu$ l de TBS. Para eliminar los desperdicios, la suspensión fue luego centrifugada a 12.000 rpm durante 10 minutos a la temperatura ambiente. La población de fagos fue recogida y almacenada a 4°C.

Titulación de los fagos

35 La titulación permite evaluar la cantidad de UT de partida para cada ronda o el título de los clones individuales (a cuya cantidad nos referimos como "entrada"). Para realizar la valoración a partir de la suspensión original de fagos, se han hecho las diluciones descritas en la Tabla 2.

Tabla 2

Muestra (1)	1 $\mu$ l de la suspensión de fagos + 99 $\mu$ l de PBS (dilución $1 \times 10^{-2}$ )
Muestra (2)	10 $\mu$ l de la muestra (1) + 90 $\mu$ l de PBS (dilución $1 \times 10^{-3}$ )
Muestra (3)	10 $\mu$ l de la muestra (2) + 90 $\mu$ l de PBS (dilución $1 \times 10^{-4}$ )
Muestra (4)	10 $\mu$ l de la muestra (3) + 90 $\mu$ l de PBS (dilución $1 \times 10^{-5}$ )
Muestra (5)	10 $\mu$ l de la muestra (4) + 90 $\mu$ l de PBS (dilución $1 \times 10^{-6}$ )
Muestra (6)	20 l de la muestra (5) en un nuevo tubo
Muestra (7)	2 $\mu$ l de la muestra (6) + 18 $\mu$ l de PBS (dilución $1 \times 10^{-7}$ )
Muestra (8)	2 $\mu$ l de la muestra (7) + 18 $\mu$ l de PBS (dilución $1 \times 10^{-8}$ )

40 100  $\mu$ l de las muestras (6), (7) y (8), es decir las de las diluciones  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-7}$  y  $1 \times 10^{-8}$  se extendieron sobre placas de Petri con agar y Tet. Las placas se incubaron durante 16 horas a 37°C. El número total de UT se evaluó luego recontando las colonias, y se refirió al volumen total.

Ensayos de fijación de clones únicos

5 Estos ensayos se realizaron con una entrada de  $10^9$  TU de cada clon, en células procedentes del linaje de células de metástasis hepática (objetivo) y en células procedentes de un hígado normal (testigo negativo). La Salida de estos experimentos se normalizó al fijar a un fago sin inserto, fd-tet, dando una medida de la interacción inespecífica debida al fago propiamente dicho. El aumento de la fijación se evaluó como la relación entre la Salida normalizada del objetivo y la Salida normalizada del testigo negativo. Todos los experimentos se repitieron por lo menos tres veces, cuando fue posible en lo referente a disponibilidad de material.

Aislamiento y amplificación de los clones

10 Cuando se observó un aumento significativo entre el número de fagos fijados a células metastásicas en comparación con los fijados a las células de un hígado normal, se aislaron clones individuales para identificar la secuencia de su inserto y para evaluar su especificidad de fijación. Para la amplificación de los clones, unas bacterias procedentes de colonias individuales se hicieron crecer en 5 ml de LB con Kan y Tet durante 16 horas a 37°C mientras que se agitaba. Luego los fagos fueron purificados tal como se ha descrito.

15 Para disgregar mecánicamente la cápsida de fagos se usaron unas perlas de resina, denominadas Perlas Strataclean por el fabricante. Antes de su uso, las perlas fueron vueltas a suspender en TBS en una relación de 1:1 en volumen/volumen. Para cada clon, se añadieron 200  $\mu$ l de una suspensión de fagos a 10  $\mu$ l de perlas y se sometieron a vorticación durante 30 segundos. Después de una centrifugación a 400 rpm durante 3 minutos, se recogieron 195  $\mu$ l de un material sobrenadante y se sometieron al mismo ciclo de disgregación. Finalmente, 150  $\mu$ l del material sobrenadante se rellenaron y completaron hasta 410  $\mu$ l con TE, y el ADN se precipitó por incubación con 0,1 volúmenes de acetato de sodio de pH 5,5 y 2,2 volúmenes de etanol al 100 %. El ADN se recogió por centrifugación durante 10 minutos a 12.000 rpm, se lavó en etanol al 70 % y se volvió a suspender en H<sub>2</sub>O ultrapura. La cantidad de ADN se evaluó tanto por lectura de su absorbencia a una longitud de onda de 260 nm como por electroforesis en geles de agarosa al 1 % en TAE.

Preparación de las muestras para la secuenciación

25 Diez microlitros de la solución, que correspondían a aproximadamente 800 ng del ADN de fagos, se incubaron con 3 pmol del siguiente cebador:  
5'-CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3' (SEQ ID NO. 202), que corresponde a una zona situada inmediatamente corriente abajo desde el inserto de oligonucleótido.

Análisis de las secuencias

30 Para traducir las secuencias de nucleótidos en secuencias de péptidos, nosotros hemos usado el programa software DNAsis V2.5.

Protocolo de inmunohistoquímica con los fagos

Las muestras de tejidos fueron embebidas en OCT y almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para el experimento, ellas fueron cortadas usando un criostato a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

35 Los tejidos fueron cortados en rodajas de 10  $\mu\text{m}$ . Estas rodajas fueron luego tratadas con una PBS durante 5 minutos hasta que se había eliminado por completo el OCT. Los tejidos fueron fijados en 4 % de PAF en PBS durante 10 minutos a la temperatura ambiente y luego fueron lavados durante 5 minutos en una PBS e incubados con 50 mM de NH<sub>4</sub>Cl en una PBS durante 20 minutos.

40 Las peroxidasas tisulares fueron luego desactivadas tratando con 3 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O durante 10 minutos en la oscuridad a la temperatura ambiente. Siguió un lavado durante 5 minutos en una PBS.

45 Los sitios de interacción inespecífica fueron bloqueados incubando las muestras en el reactivo "bloque DAKO" durante 30 minutos a la temperatura ambiente. Se añadieron luego fagos (desde  $1 \times 10^6$  hasta  $5 \times 10^6$  UT totales) diluidos en el reactivo "diluyente DAKO"; la incubación duró durante una noche a 4°C. Después de 4 lavados durante 5 minutos cada uno en TBS, las muestras fueron teñidas con un anticuerpo anti fago M13 policlonal de conejo (Sigma B7786), fueron diluidas a 1:500 en el reactivo "diluyente DAKO" durante 1 hora a la temperatura ambiente.

La marcación se realizó usando un anticuerpo anti-conejo de "EnVision DAKO" secundario, desarrollado con el substrato de AEC durante 5 minutos y seguido por una contratinción con hematoxilina de Mayer.

Purificación del péptido fusionado con GST

50 Algunos de los péptidos seleccionados se produjeron en Escherichia coli como una proteína de fusión con GST, usando protocolos de purificación clásicos.

Preparación y lisis de las bacterias:

1. se inoculan las bacterias y se dejan crecer durante una noche en un caldo de 20 TB/Amp a 30°C;
- 5 2. se transfieren las bacterias a 300 ml de un caldo TB/Amp a 30°C; se agita durante 1 hora;
3. se añade IPTG (hasta una concentración final de 1 mM) y se incuba durante 2 horas;
4. se centrifuga a 5.000 rpm durante 15 minutos a 4°C;
5. se vuelven a suspender las bacterias en 10 ml de un tampón A;
- 10 6. se centrifuga a 3.000 rpm durante 20 minutos a 4°C;
7. se vuelve a suspender el sedimento en 5 ml, se tratan las bacterias con ultrasonidos con cuatro impulsos, cada uno durante 20 segundos con 35 % de la potencia;
8. se centrifuga a 11.000 rpm durante 20 minutos a 4°C y se recoge el material
- 15 sobrenadante.

Preparación de una resina de glutatión - agarosa

9. se hidratan 250 µl de la resina en H<sub>2</sub>O destilada, en rotación durante 1 hora;
10. se lava la resina 3 veces en el tampón A y finalmente se vuelve a suspender en un volumen igual del tampón A.

20 Purificación de las proteínas recombinantes:

11. se añaden 250 µl de la resina a la muestra de la etapa 8;
12. se hace girar a 4°C durante 1 hora;
13. se lava 3 veces en el tampón A;
14. se evalúa la concentración mediante una electroforesis seguida por
- 25 una tinción con azul de Coomassie.

Mezcla de polimerización para la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (Tabla 3).

Tabla 3

12 % de gel en funcionamiento	acrilamida/bis-acrilamida (4 ml) 1,5 M de Tris de pH 8,8 (3,75 ml) 10 % de SDS (0,1 ml) agua bidestilada (2,15 ml) persulfato de amonio (100 mg/ml) (33 µl) TEMED (8 µl)
5 % de gel de apilamiento	acrilamida/bis-acrilamida (0,8 ml) 0,5 M de Tris de pH 6,8 (650 ml) 10 % de SDS (0,05 ml) agua bidestilada (3,55 ml) persulfato de amonio (100 mg/ml) (30 µl) TEMED (8 µl)

Tinción con azul de Coomassie

1. se incuba el gel con azul de Coomassie durante 30-45 minutos en suave agitación,
2. se destiñe en una mezcla de 45 % de metanol y 10 % de ácido acético;
3. se vuelve a hidratar en agua, eventualmente se seca sobre papel.

5

Lisis de células

Veinte platos de 100x20 mm de HepG2 (de hepatoma) o NCI-H630 (metástasis de hígado secundaria para un carcinoma colorrectal) se separaron mecánicamente en una PBS y se volvieron a suspender en 2 volúmenes del tampón H, con 10 % de glicerol y 0,1 % de Nonidet-P40. Estas suspensiones se incubaron durante 30 minutos a 4°C mediando agitación y luego se centrifugaron a 2.500 rpm durante 30 minutos a 4°C. La concentración de la proteína se evaluó mediante el estuche BCA (de Pierce), siguiendo las instrucciones del fabricante.

10

Ensayo de demolición

Los péptidos GST fijados a la resina se incubaron durante una noche a 4°C con leche y se lavaron 7 veces en el tampón A. 10 mg del material lisado proteínico total se incubaron con 12 µg del complejo de GST-resina a 4°C durante 1 hora dos veces para eliminar las proteínas que se fijan de una manera no específica a los GST o a la resina. El ensayo de demolición se realizó en las proteínas no fijadas, con 12 µg del complejo de GST-péptido-resina, durante una noche a 4°C.

15

Después de 4 lavados en el tampón A, las proteínas fijadas al complejo de GST-péptido-resina se eluyeron en 20 mM de glutatión durante 30 minutos a 4°C y se recogieron por centrifugación a 3.000 rpm durante 2 minutos a 4°C.

20

El material sobrenadante se cargo en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 10 %. Luego, este gel se tiñó con una solución de azul de Coomassie y las bandas específicas se recogieron y analizaron mediante una espectrometría de masas y una micro-secuenciación (con protocolos clásicos normalizados).

RESULTADOS25 Búsqueda de motivos de péptidos que sean específicos para metástasis hepáticas humanas

Con el fin de encontrar unos péptidos que se fijan específicamente a metástasis hepáticas humanas, se realizaron unos escrutinios en bibliotecas de fagos acerca de células suspendidas que se derivan de un hígado normal y de muestras de metástasis, que se han retirado quirúrgicamente desde el hígado de los pacientes. En esta fase, se usaron 11 pares de muestras procedentes de diferentes pacientes (pacientes 2, 5, 6, 7, 8, 16, 17, 18, 19, 21, 23). En casi todas las muestras, las metástasis hepáticas eran secundarias para tumores primarios del colon o del recto, con la exclusión del paciente 8, que tenía un hemangioma cerebral como tumor primario (Tabla 4).

30

Tabla 4.

Paciente	Sexo	Edad	Lugar <sup>1</sup>	TN <sup>2</sup>	Marcador <sup>3</sup>	Virus <sup>4</sup>	Necrosis <sup>5</sup>
2	F	60	Colon	T3N0	CEA	No	40%
5	M	46	Colon	T4N2	CEA	No	60%
6	M	72	Colon	T3N2	CEA	No	50%
8	F	31	Cerebro			No	
7	M	64	Colon	T3N1	GICA	No	15%
16	M	45	Colon	T4N2		No	20%
17	M	70	Colon	T3N0		No	80%
18	F	62	Colon	T4N0	CEA, GICA	No	60%
19	M	66	Colon	T3N0	CEA	No	50%
21	M	59	Recto	T3N0		No	<5%
23	F	49	Colon			No	50%

- 1: sitio del tumor primario;
- 2: clasificación según TN del tumor primario;
- 3: marcadores de tumores;
- 4: evidencia de virus de la hepatitis B o C en el hígado;
- 5: porcentaje de necrosis dentro de las metástasis.

En la Tabla 4, se muestran los parámetros clínicos de los pacientes usados para la selección. Para los pacientes 2, 6, 7 (2 experimentos), 16, 17, 18, 19 y 21 se usó la biblioteca CX<sub>7</sub>C; para el paciente 8, se usaron las bibliotecas tanto CX<sub>7</sub>C como CX<sub>3</sub>CX<sub>3</sub>CX<sub>3</sub>C en muestras de dos diferentes metástasis; para el paciente 23 se usó la biblioteca CX<sub>9</sub>. Para cada experimento se realizaron 4 rondas de selección y amplificación.

#### 10 Análisis de las secuencias de péptidos obtenidas en los experimentos de escrutinio

En cada experimento en el que hemos observado un aumento significativo de la relación de fijación a las células de metástasis hepáticas y al testigo negativo (tejido de hígados macroscópicamente sano), se amplificaron y purificaron 20 clones de fagos. El ADN de cada clon se purificó y se secuenció para deducir el motivo de péptido. Los péptidos seleccionados se muestran en la Figura 1.

- 15 Algunas secuencias están representadas particularmente, tanto en un mismo experimento como en experimentos realizados en muestras de diferentes pacientes. En los experimentos realizados en los pacientes 2, 5, 6, 7, 8, 21 y 23 se seleccionaron unos péptidos que compartían secuencias comunes, particularmente motivos de trí/tetra-péptidos (entre los cuales se hallan GGG, RGL, GRL, GSG, LGR, GLS, SAD, YEG y GSGS). En los experimentos realizados en los pacientes 16, 17 y 18 hemos encontrado más secuencias repetidas. En estos experimentos aparecieron asimismo unos motivos que tenían una alta homología con los antes descritos. El péptido más repetido es el LRS.

#### Análisis de las secuencias seleccionadas

- 25 La atención se enfocó hacia el estudio de las secuencias obtenidas en los experimentos 16, 17 y 18, en particular las: ARPGLRS (SEQ ID NO. 1); MRYALRS (SEQ ID NO. 2); LRPGLRS (SEQ ID NO. 3); LRSGSGS (SEQ ID NO. 4); VRSGRGS (SEQ ID NO. 5); GIYRLRS (SEQ ID NO. 6); y GYSLRS (SEQ ID NO. 7). Con el fin de identificar unas homologías entre secuencias entre estos péptidos y estas proteínas, se hizo una búsqueda en el banco de datos BLAST. A partir de estos análisis apareció que un número significativo de péptidos comparten homologías de secuencias con proteínas de la matriz extracelular y con moléculas de adhesión/movilidad celular.

#### Experimentos de fijación en linajes celulares

- 30 Para evaluar si los insertos seleccionados eran ligandos específicos para un determinante superficial expresado peculiarmente en las metástasis hepáticas, los 7 clones fueron ensayados en los linajes celulares descritos en la Tabla 1. Un resumen de los resultados se muestra en las Tablas 5 y 6.

- 35 En este modelo de estudio, unas secuencias seleccionadas de péptidos no se fijan a células que se derivan de tumores primarios (con la excepción del BT-474). Por el contrario, estas secuencias se fijan preferentemente a células derivadas de metástasis hepáticas (6 de 7 clones se fijan a células de metástasis hepáticas que son secundarias para un tumor de colon primario), 3 de 7 clones se fijan a células de metástasis hepáticas que son secundarias para un tumor de estómago o de pulmón.

Tabla 5.

SEQ ID NO.	Hep-G2 Tumor de hígado	SW480 Tumor de colon	SW620 Nódulo linfático metástasis de tumor de colon	NCI-H630 Metástasis hepática de tumor de colon	AGS Tumor de estómago	NCI-N87 Metástasis hepática de tumor de estómago
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	+	+	-	+
3	-	-	-	+	-	-
4	-	-	-	+	-	+
5	-	-	-	+	-	+
6	-	-	-	+	-	-
7	-	+	-	-	-	-

Tabla 6.

SEQ ID NO.	Capan-2 Tumor de páncreas	Capan-1 Metástasis hepática procedente de un tumor de páncreas	BT-474 Tumor de mama	MCF-7 Efusión pleural de tumor de mama	A549 Tumor de pulmón	NCI-H1688 Metástasis hepática de tumor de pulmón
1	-	-	-	-	-	+
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	+	+	+	+
5	-	-	+	-	-	-
6	-	-	-	+	-	+
7	-	-	-	-	+	-

#### Experimentos de fijación en células primarias

5 Con fin de evaluar si los insertos seleccionados eran específicos para determinantes superficiales ubicuos en metástasis hepáticas humanas, los 7 clones seleccionados se ensayaron en células primarias de metástasis hepáticas, en comparación con un hígado normal de los mismos pacientes. Para estos ensayos de fijación, se usaron muestras procedentes de 9 pacientes (20, 21, 22, 25, 26, 27, 28, 31, 32), en las mismas condiciones que se han descrito para los linajes celulares. Un resumen de los resultados se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7.

SEQ ID NO.	P nº20	P nº21	Pz. nº22	P nº25	P nº26	P nº27	P nº28	P nº31	P nº32
1	+				+	+	+	+	+
2	+				+	-	-	+	+
3	+	+			+	+	+	+	+
4	-		+		+	+	+	+	+
5			-		+	+	+	+	+
6				+	+	+	+	+	+
7		+	+		+	+	+	+	+

En los primeros experimentos, debido a los bajos números de células, relacionados con la fase de establecimiento del proceso de purificación, se evaluó la fijación de solamente algunos clones. En general, se han realizado 3 ensayos para cada muestra. A partir de todos estos experimentos aparece que el clon menos funcional como marcador de diagnóstico universal es el que presenta la secuencia MRYALRS (SEQ ID NO. 2), que dio resultados negativos en dos ensayos (27, 28), mientras que los clones que trabajaban en todas las muestras son los que exponen las secuencias ARPGLRS (SEQ ID NO. 1), LRPGLRS (SEQ ID NO. 3), GIYRLRS (SEQ ID NO. 6) y GVYSLRS (SEQ ID NO. 7). Es interesante hacer observar que, en los experimentos de células recientes, los aumentos de la fijación son mucho más altos que en los realizados con los linajes de células cultivadas.

#### 10 Experimentos de superposición de la fijación en muestras de tejidos

15 Unos ensayos de superposición de la fijación con unos fagos que tenían las secuencias GIYRLRS (SEQ ID NO. 6) y GVYSLRS (SEQ ID NO. 7) se realizaron en 64 muestras de tejidos (tejidos de tumores y de metástasis procedentes de diferentes 37 diferentes pacientes): 18 muestras de metástasis hepáticas y de un tejido sano consanguíneo; 4 muestras de un tumor de colon primario; 2 muestras de un tumor de recto primario; 2 muestras de un colon sano; 3 muestras de un tumor de mama primario; 6 muestras de un tumor de ovario primario con metástasis omentales consanguíneas (uno con metástasis en sigma); 2 metástasis de pulmón secundarias para tumores colorrectales y 2 metástasis de pulmón secundarias para un tumor renal. Los resultados de todos los ensayos se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8

Tipo de tejido	Resultado	% de muestras positivas
metástasis hepática secundaria para un tumor colorrectal	+++	75
colon sano	-	0
hígado sano	-	0
tumor colorrectal primario	-	0
tumor de ovario primario	-+	10
metástasis omental de tumor de ovario	-+	10
metástasis en sigma de tumor de ovario	-	0
metástasis en pulmón de tumor colorrectal	-	0
metástasis en pulmón de tumor renal	-	0

#### 20 Purificación de receptores

La búsqueda en cuanto a moléculas específicamente presentes en las superficies de las células metastásicas se realizó mediante experimentos de demolición, usando las de NCI-H630 (como un substrato, que es

positivo para la fijación de 6 de 7 fagos) y de HepG2 (como un testigo, que es negativo para fijación de todos los fagos). La demolición se realizó usando el péptido GIYRLRS (SEQ ID NO. 6), presente en forma de una fusión con la proteína GST. Este experimento se repitió tres veces. En la Figura 3 se muestra un gel de poliacrilamida desnaturalizante, en el que las proteínas fijadas a GIYRLRS-GST han sido separadas y teñidas con azul de Coomassie. En la figura: MM, marcadores del peso molecular, HepG2, material lisado de las células HepG2; NCI-H630, material lisado de las células NCI-H630; los números 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25 indican los pesos moleculares patrones; los números de 1 a 9 indican las bandas analizadas. Las proteínas fueron identificadas por espectrometría de masas.

El asunto de los siguientes párrafos está también comprendido por el presente invento:

- 10 1. Un péptido capaz de fijarse selectivamente a células metastásicas, que tiene el motivo de secuencia LRS, una longitud de 6 a 100 aminoácidos y que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el conjunto que se compone de: ARPGLRS (SEQ ID NO. 1), MRYALRS (SEQ ID NO. 2), LRPGLRS (SEQ ID NO. 3), LRSGSGS (SEQ ID NO. 4), GIYRLRS (SEQ ID NO. 6), GVYSLRS (SEQ ID NO. 7), LRSGRGS (SEQ ID NO. 96), RREGLRS (SEQ ID NO. 110), SWYTLRS (SEQ ID NO. 111), LAYRLRS (SEQ ID NO. 113), LTYRLRS (SEQ ID NO. 115), VRPGLRS (SEQ ID NO. 117) y LRSGRGS (SEQ ID NO. 119).
- 15 2. Un péptido del párrafo 1, en el que dichas células metastásicas son células de metástasis hepáticas humanas.
3. Un péptido de una cualquiera de los párrafos 1 ó 2, que es un péptido cíclico.
- 20 4. Un péptido de una cualquiera de los párrafos 1-3, que comprende por lo menos un aminoácido modificado, un aminoácido no usual y/o un aminoácido en la conformación D.
5. Un conjugado que comprende por lo menos un péptido capaz de fijarse selectivamente a células metastásicas de uno cualquiera de los párrafos 1-4, y por lo menos una molécula.
- 25 6. Un conjugado del párrafo 5, en el que dicha por lo menos una molécula se selecciona entre un fármaco, un agente quimioterapéutico, un radioisótopo, un agente pro-apoptótico, un agente anti-angiogénico, una hormona, una citocina, un agente citotóxico, un agente citostático, un péptido, una proteína, un anticuerpo y un fragmento de anticuerpo tal como fragmento Fab.
- 30 7. Un conjugado del párrafo 6, en el que dicho agente anti-angiogénico se selecciona entre el conjunto que se compone de tromboespondina, angiostatina, el factor derivado de epitelio pigmentado, angiotensina, péptidos de laminina, péptidos de fibronectina, agentes inhibidores del activador de plasminógeno, agentes inhibidores de metaloproteinasas tisular, interferones, interleucina 12 (IL-12), el factor de plaquetas 4, IP-10, 2-metoxiestradiol, una proteína relacionada con proliferina, carboxiamidotriazol, CM101, marimastat, polisulfato de pentosán, angiopoyetina 2, interferón-alfa, herbimicina A, PNU145156E, un fragmento de prolactina de 16K, linomida, talidomida, pentoxifilina, genisteína, TNP-470, endostatina, paclitaxel, docetaxel, poliaminas, un agente inhibidor de proteasomas, un agente inhibidor de cinasas, un péptido de señalización, accutin, cidofovir, vincristina, bleomicina, AGM-1470, el factor de plaquetas 4 y minociclina.
- 35 8. Un conjugado del párrafo 6, en el dicho agente pro-apoptótico se selecciona entre el conjunto que consiste en etopósido, esfingomielina de ceramida, Bax, Bid, Bik; Bad, caspasa-3, caspasa-8, caspasa-9, fas, ligando de fas, fadd, fap-1, tradd, faf, rip, reaper, apoptina, la enzima convertidora de interleucina-2 y anexina V.
- 40 9. Un conjugado del párrafo 6, en el que dicha citocina está seleccionada entre el conjunto que consiste en interleucina 1 (IL-1), IL-2, IL-5, IL-10, IL-11, IL-12, IL-18, interferón gamma (IF-gama), IF-alfa, IF-beta, factor de necrosis de tumor alfa (TNF-alfa), y GM-CSF factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.
- 45 10. Un conjugado del párrafo 5, en el que dicha por lo menos una molécula se selecciona entre un virus, un bacteriófago, una bacteria, un liposoma, una micropartícula, una perla magnética, una nanopartícula, una célula de levadura, y una célula de mamífero.
11. Un conjugado del párrafo 10, en el que dicho virus se selecciona entre un adenovirus, un retrovirus, un virus asociado con adeno y un lentivirus.
12. Un conjugado del párrafo 5, en el que dicha por lo menos una molécula es un agente de diagnóstico.
- 50 13. Un conjugado del párrafo 12, en el que dicho agente de diagnóstico es un agente de diagnóstico para un uso in vivo.
14. Un conjugado del párrafo 13, en el que dicho agente de diagnóstico se selecciona entre iones paramagnéticos o radioisótopos.



15. Un conjugado del párrafo 12, en el que dicho agente de diagnóstico es un agente de diagnóstico para ensayos in vitro.
- 5 16. Un ácido nucleico que codifica un péptido capaz de fijarse selectivamente a células metastásicas, que tiene el motivo de secuencia LRS, una longitud de 6 a 100 aminoácidos de secuencia y que comprende por lo menos una secuencia de aminoácidos que se selecciona entre el conjunto que se compone de: ARPGLRS (SEQ ID NO. 1), MRYALRS (SEQ ID NO. 2), LRPGLRS (SEQ ID NO. 3), LRSGSGS (SEQ ID NO. 4), GIYRLRS (SEQ ID NO. 6), GVYSLRS (SEQ ID NO. 7), LRSGRGS (SEQ ID NO. 96), RREGLRS (SEQ ID NO. 110), SWYTLRS (SEQ ID NO. 111), LAYRLRS (SEQ ID NO. 113), LTYRLRS (SEQ ID NO. 115), VRPGLRS (SEQ ID NO. 117) y LRSGRGS (SEQ ID NO. 119).
- 10 17. Una formulación que comprende por lo menos un péptido capaz de fijarse específicamente a células metastásicas, de uno cualquiera de los párrafos 1-4.
18. Una formulación del párrafo 17, en la que dicho por lo menos un péptido está conjugado con un fármaco.
19. Una formulación del párrafo 18, en la que dicho fármaco es un agente terapéutico capaz de tener un efecto citotóxico, citostático, pro-apoptótico o anti-angiogénico sobre células de metástasis hepáticas.
- 15 20. Una formulación del párrafo 18, en el dicho fármaco es un agente alquilante, un anti-metabolito o un antibiótico.
21. Una formulación del párrafo 18, en la que dicho por lo menos un péptido está conjugado con un agente de diagnóstico.
- 20 22. Una formulación del párrafo 21, en la que dicho agente de diagnóstico es un agente de diagnóstico para un uso in vivo.
23. Una formulación del párrafo 21, en la que dicho agente de diagnóstico es un agente de diagnóstico para ensayos in vitro.
24. Una formulación de cualquiera de los párrafos 17-23, que es una formulación farmacéutica.
- 25 25. Una formulación de cualquiera de los párrafos 17-24, que incluye por lo menos un vehículo y/o excipiente aceptable.
26. Uso de un péptido de cualquiera de los párrafos 1-4 para la producción de una formulación de diagnóstico destinada a la localización de células metastásicas en un individuo con un tumor, particularmente con un tumor de colon.
27. Uso del párrafo 26, en el que dichas células metastásicas son células de metástasis hepáticas.
- 30 28. Uso del párrafo 26 ó 27, en el que dicha formulación está destinada para un uso in vivo.
29. Uso del párrafo 26 ó 27, en el que dicha formulación está destinada a ensayos in vitro.
30. Uso de un péptido de cualquiera de los párrafos 1-4 para la producción de un medicamento destinado a la terapia antitumoral en un individuo portador de un tumor.
- 35 31. Uso de un ácido nucleico del párrafo 16 para la producción de un medicamento destinado a la terapia antitumoral en un individuo portador de un tumor.
32. Uso del párrafo 31, en el que dicha terapia antitumoral es una terapia génica.
33. Un procedimiento in vitro para obtener un péptido capaz de fijarse selectivamente a una célula metastásica, que tiene un motivo de secuencia LRS y que tiene una longitud de 6 a 100 aminoácidos, comprendiendo el procedimiento (1) poner en contacto la célula metastásica o un tejido que contiene células metastásicas con una pluralidad de fagos, en que cada fago presenta secuencias de péptidos heterólogos incorporadas dentro de una proteína cápsida, (2) retirar los fagos que se fijan a las células o los tejidos, (3) aislar los fagos que se fijan a la célula o al tejido, y opcionalmente (4) identificar las secuencias de péptidos heterólogos.
- 40 34. Un procedimiento in vitro del párrafo 33, en el que dichas células metastásicas son células metastásicas hepáticas.
- 45 35. Un procedimiento in vitro del párrafo 34, en el que dichas células metastásicas hepáticas se derivan de un tumor colorrectal primario.

- 5 36. Un procedimiento in vitro de una cualquiera de los párrafos 33-35, en el que dicho péptido comprende por lo menos una secuencia seleccionada entre el conjunto que se compone de: ARPGLRS (SEQ ID NO. 1), MRYALRS (SEQ ID NO. 2), LRPGLRS (SEQ ID NO. 3), LRSGSGS (SEQ ID NO. 4), GIYRLRS (SEQ ID NO. 6), GVYSLRS (SEQ ID NO. 7), LRSGRGS (SEQ ID NO. 96), RREGLRS (SEQ ID NO. 110), SWYTLRS (SEQ ID NO. 111), LAYRLRS (SEQ ID NO. 113), LTYRLRS (SEQ ID NO. 115), VRPGLRS (SEQ ID NO. 117) y LRSGRGS (SEQ ID NO. 119).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Arap, W., Pasqualini, R. & Rouslahti, E. Chemotherapy targeted to tumor vasculature [Quimioterapia dirigida a una vasculatura tumoral]. *Curr. Opin. Oncol.* 10 560-565 (1998).
- 5 2. Pasqualini, R., Arap, W. Rajotte, D. & Rouslahti, E. En Phage display: a laboratory manual [Presentación en fagos: un manual de laboratorio] (coordinadores de edición Barbas, C. F., Burton, D. R., Scott, J. K. & Silverman, G. J.) 1-24 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2000).
3. Del Gatto, A. y colaboradores Novel and selective alpha(v)beta3 receptor peptide antagonist: design, synthesis, and biological behavior [Nuevo y selectivo agente antagonista del péptido del receptor alfa(v)beta3 selectivo: diseño, síntesis, y comportamiento biológico]. *J Med Chem* 49, 3416-20 (2006).
- 10 4. Colombo, G. y colaboradores Structure-activity relationships of linear and cyclic peptides containing the NGR tumor-homing motif [Relaciones entre estructura y actividad de péptidos lineales y cíclicos que contienen el motivo mensajero de tumores NGR]. *J. Biol Chem* 277, 47891-7 (2002)
- 5 5. Corti, A. & Ponzoni, M. Tumor vascular targeting with tumor necrosis factor alpha and chemotherapeutic drugs [Dirección hacia un objetivo vascular de tumor con el factor de necrosis de tumores alfa y fármacos quimioterapéuticos]. *Ann N Y Acad Sci* 1028, 104-12 (2004).
- 15 6. Curnis, F. y colaboradores Differential binding of drugs containing the NGR motif to CD13 isoforms in tumor vessels, epithelia, and myeloid cells [Fijación diferencial de fármacos que contienen el motivo NGR a isoformas de CD13 en vasos de tumores, epitelios y células mieloides]. *Cancer Res* 62, 867-74 (2002)
- 20 7. Di Matteo, P. y colaboradores Immunogenic and structural properties of the Asn-Gly-Arg (NGR) tumor neovasculature-homing motif [Propiedades inmunogénicas y estructurales del motivo Asn-Gly-Arg (NGR) mensajero a la neovasculatura de un tumor]. *Mol Immunol* 43, 1509-18 (2006).
8. Koivunen, E., Wang, B. & Rouslahti, E., Isolation of a highly specific ligand for the alpha 5 beta 1 integrin from a phage display library [Aislamiento de un ligando altamente específico para la alfa 5 beta 1 integrina a partir de una biblioteca de presentación en fagos]. *J. Cell Biol* 124, 373-80 (1994).
- 25 9. Pasqualini, R. y colaboradores Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis [La aminopeptidasa N es un receptor para péptidos mensajeros a tumores y un objetivo para inhibir la angiogénesis]. *Cancer Res* 60, 722-7 (2000).
10. Pastorino, F. y colaboradores Vascular damage and anti-angiogenic effects of tumor vessel-targeted liposomal chemotherapy [Efectos de daño vascular y anti-angiogénicos de una quimioterapia con liposomas dirigida hacia un objetivo de vasos de un tumor], *Cancer Res* 63, 7400-9 (2003).
- 30 11. Burg, M. A., Pasqualini, R., Arap, W. Ruoslahti, E. & Stallcup, W. B. NG2 proteoglycan-binding peptides target tumor neovasculature [Unos péptidos que fijan proteoglicanos NG2 se dirigen al objetivo de una neovasculatura de un tumor] *Cancer Res.* 59, 2869-2874 (1999).
12. Koivunen, E. y colaboradores Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor [Dirección al objetivo de un tumor con un agente inhibidor selectivo de la gelatinasa]. *Nat. Biotechnol.* 17, 768-774 (1999).
- 35 13. Ellerby, H. M. y colaboradores Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides [Actividad anticancerosa de péptidos pro-apoptóticos dirigidos a una diana]. *Nat. Med.* 5, 1032-1038 (1999).
14. Scott, J. K. & Smith, G.P. Searching for peptide ligands with an epitope library [Búsqueda de ligandos de péptidos con una biblioteca de epítomos]. *Science* 249, 386-390 (1990).
- 40 15. Smith G.P. & Scott, J. K. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage [Bibliotecas de péptidos y proteínas presentadas en un fago filamentoso]. *Methods Enzymol.* 217, 228-257 (1993).

## REIVINDICACIONES

1. Un péptido capaz de fijarse selectivamente a células metastásicas, preferiblemente células de metástasis hepáticas humanas, que tiene el motivo de secuencia LRS, una longitud de 6 a 100 aminoácidos y que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el conjunto que se compone de: ARPGLRS (SEQ ID NO. 1), MRYALRS (SEQ ID NO. 2), LRPGLRS (SEQ ID NO. 3), LRSGSGS (SEQ ID NO. 4), GIYRLRS (SEQ ID NO. 6), GVYSLRS (SEQ ID NO. 7), LRSGRGS (SEQ ID NO. 96), RREGLRS (SEQ ID NO. 110), SWYTLRS (SEQ ID NO. 111), LAYRLRS (SEQ ID NO. 113), LTYRLRS (SEQ ID NO. 115), VRPGLRS (SEQ ID NO. 117) y LRSGRGS (SEQ ID NO. 119).
2. Un péptido de la reivindicación 1, que es un péptido cíclico.
3. Un péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, que comprende por lo menos un aminoácido modificado, un aminoácido no usual y/o un aminoácido en la conformación D.
4. Un conjugado que comprende por lo menos un péptido capaz de fijarse selectivamente a células metastásicas de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, y por lo menos una molécula.
5. Un conjugado de la reivindicación 4, en el que dicha por lo menos una molécula se selecciona entre un fármaco, un agente quimioterapéutico, un radioisótopo, un agente anti-apoptótico, un agente anti-angiogénico, una hormona, una citocina, un agente citotóxico, un agente citostático, un péptido, una proteína, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fab, un virus, un bacteriófago, una bacteria, un liposoma, una micropartícula, una perla magnética, una nanopartícula, una célula de levadura y una célula de mamífero, en el que
- dicho agente anti-angiogénico se selecciona preferiblemente entre el conjunto que consiste en tromboespondina, angioestatina, el factor derivado de epitelio pigmentado, angiotensina, péptidos de laminina, péptidos de fibronectina, agentes inhibidores del inhibidor de plasminógeno, agentes inhibidores de metaloproteínasa tisular, interferones, interleucina 12 (IL-12), el factor de plaquetas 4, IP-10, 2-metoxiestradiol, la proteína relacionada con proliferina, carboxiamidotriazol, CM 101, marimastat, polisulfato de pentosán, angiopoyetina 2, interferón-alfa, herbimicina A, PNU145156E, un fragmento de prolactina de 16K, linomida, talidomida, pentoxifilina, genisteína, TNP-470, endostatina, paclitaxel, docetaxel, poliaminas, un agente inhibidor de proteasomas, un agente inhibidor de cinasas, un péptido de señalización, accutin, cidofovir, vincristina, bleomicina, AGM-1470, el factor de plaquetas 4 y minociclina,
- dicho agente pro-apoptótico se selecciona preferiblemente entre el conjunto que consiste en etopósido, esfingomielina de ceramida, Bax, Bid, Bik; Bad, caspasa-3, caspasa-8, caspasa-9, fas, ligando de fas, fadd, fap-1, tradd, faf, rip, reaper, apoptina, enzima convertidora de interleucina-2 y anexina V,
- dicha citocina está seleccionada preferiblemente entre el conjunto que consiste en interleucina 1 (IL-1), IL-2, IL-5, IL-10, IL-11, IL-12, IL-18, interferón gamma (IF-gamma), IF-alfa, IF-beta, el factor de necrosis de tumores alfa (TNF-alfa), y GM-CSF (el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos) y
- dicho virus está seleccionado preferiblemente entre un adenovirus, un retrovirus, un virus asociado con adeno y un lentivirus.
6. Un conjugado de la reivindicación 4, en el que dicha por lo menos una molécula es un agente de diagnóstico destinado a un uso in vivo, seleccionado preferiblemente entre iones paramagnéticos o radioisótopos, o para ensayos in vitro.
7. Un ácido nucleico que codifica un péptido capaz de fijarse selectivamente a células metastásicas, que tiene el motivo de secuencia LRS, una longitud de 6 a 100 aminoácidos de secuencia y comprende por lo menos una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el conjunto que se compone de: ARPGLRS (SEQ ID NO. 1), MRYALRS (SEQ ID NO. 2), LRPGLRS (SEQ ID NO. 3), LRSGSGS (SEQ ID NO. 4), GIYRLRS (SEQ ID NO. 6), GVYSLRS (SEQ ID NO. 7), LRSGRGS (SEQ ID NO. 96), RREGLRS (SEQ ID NO. 110), SWYTLRS (SEQ ID NO. 111), LAYRLRS (SEQ ID NO. 113), LTYRLRS (SEQ ID NO. 115), VRPGLRS (SEQ ID NO. 117) y LRSGRGS (SEQ ID NO. 119).
8. Una formulación que comprende por lo menos un péptido capaz de fijarse específicamente a células metastásicas de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
9. Una formulación de la reivindicación 8, en la que dicho por lo menos un péptido está conjugado con un fármaco, preferiblemente con un agente terapéutico capaz de tener un efecto citotóxico, citostático, pro-apoptótico o anti-angiogénico sobre células de metástasis hepáticas, un agente alquilante, un anti-metabolito o un antibiótico.
10. Una formulación de la reivindicación 8, en la que dicho por lo menos un péptido está conjugado con un agente de diagnóstico destinado a un uso in vivo o para ensayos in vitro.

11. Una formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, que es una formulación farmacéutica que incluye preferiblemente por lo menos un vehículo y/o un excipiente aceptable.

5 12. Uso de un péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para la producción de una formulación de diagnóstico destinada a un uso in vivo o para ensayos in vitro para la localización de células metastásicas, preferiblemente células de metástasis hepáticas, en un individuo con un tumor, particularmente con un tumor de colon.

13. Uso de un péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o de un ácido nucleico de la reivindicación 7, para la producción de un medicamento destinado a la terapia antitumoral en un individuo portador de un tumor.

10 14. Un procedimiento in vitro para obtener un péptido capaz de fijarse selectivamente a células metastásicas, preferiblemente células metastásicas hepáticas, que se derivan particularmente de un tumor colorrectal primario, que tiene un motivo de secuencia LRS y que tiene una longitud de 6 a 100 aminoácidos, en que el procedimiento comprende (1) poner en contacto la célula metastásica o un tejido que contiene células metastásicas con una pluralidad de fagos, en que cada fago presenta secuencias de péptidos heterólogos incorporadas dentro de una proteína cápsida, (2) retirar los fagos que no se fijan a las células o a los tejidos, (3) aislar los fagos que se fijan a la célula o al tejido, y opcionalmente (4) identificar las secuencias de péptidos heterólogos.

15

20 15. Un procedimiento in vitro de la reivindicación 14, en el que dicho péptido comprende por lo menos una secuencia seleccionada entre el conjunto que se compone de: ARPLRS (SEQ ID NO. 1), MRYALRS (SEQ ID NO. 2), LRPGLRS (SEQ ID NO. 3), LRSGSGS (SEQ ID NO. 4), GIYRLRS (SEQ ID NO. 6), GVYSLRS (SEQ ID NO. 7), LRSGRGS (SEQ ID NO. 96), RREGLRS (SEQ ID NO. 110), SWYTLRS (SEQ ID NO. 111), LAYRLRS (SEQ ID NO. 113), LTYRLRS (SEQ ID NO. 115), VRPGLRS (SEQ ID NO. 117) y LRSGRGS (SEQ ID NO. 119).

## Figura 1

ARPGRLRS	SEQ ID NO. 1
MRYALRS	SEQ ID NO. 2
LRPGLRS	SEQ ID NO. 3
LRSGSGS	SEQ ID NO. 4
VRSGRGS	SEQ ID NO. 5
GIYRLRS	SEQ ID NO. 6
GVYSLRS	SEQ ID NO. 7
KYPFDKL	SEQ ID NO. 8
KVYESWS	SEQ ID NO. 9
GLDTLLV	SEQ ID NO. 10
QSRMLRI	SEQ ID NO. 11
AAFLOGG	SEQ ID NO. 12
RSYFEML	SEQ ID NO. 13
YLHLLPP	SEQ ID NO. 14
RPTLITP	SEQ ID NO. 15
ASRVRLP	SEQ ID NO. 16
MYVVHAD	SEQ ID NO. 17
GPTLIKL	SEQ ID NO. 18
APALYHV	SEQ ID NO. 19
SVDSQMG	SEQ ID NO. 20
VVSMVGV	SEQ ID NO. 21
HLLAVSY	SEQ ID NO. 22
PGCALGS	SEQ ID NO. 23
AAGEWSG	SEQ ID NO. 24
PRLGHGS	SEQ ID NO. 25
RAGGGRL	SEQ ID NO. 26
LTVRAVD	SEQ ID NO. 27
PLGWLSY	SEQ ID NO. 28
CHRTMRN	SEQ ID NO. 29
LRGGIGV	SEQ ID NO. 30
FFDGAGS	SEQ ID NO. 31
RRIDDFR	SEQ ID NO. 32
HLSLAGL	SEQ ID NO. 33
RPRTDTY	SEQ ID NO. 34
FSQKLA	SEQ ID NO. 35
TMETGGS	SEQ ID NO. 36
GVRSVRN	SEQ ID NO. 37
HSQRFK	SEQ ID NO. 38
VSALELS	SEQ ID NO. 39
AGMVLWT	SEQ ID NO. 40
PDGRFVG	SEQ ID NO. 41

## Figura 1 (cont.)

ESPSRHT	SEQ ID NO. 42
ARGFPGV	SEQ ID NO. 43
QSSSVIL	SEQ ID NO. 44
RWTSSRS	SEQ ID NO. 45
AYTNFVY	SEQ ID NO. 46
SVLENAI	SEQ ID NO. 47
LVGNFGL	SEQ ID NO. 48
GLVGSRV	SEQ ID NO. 49
RTFSKLG	SEQ ID NO. 50
GSIVMLS	SEQ ID NO. 51
AGGGLLR	SEQ ID NO. 52
GVRLTA	SEQ ID NO. 53
WGAEWSS	SEQ ID NO. 54
VREDKGI	SEQ ID NO. 55
LFILVSG	SEQ ID NO. 56
ASWTARV	SEQ ID NO. 57
GRFMGAF	SEQ ID NO. 58
NRTRFSS	SEQ ID NO. 59
VLGIAVS	SEQ ID NO. 60
ELAQAIS	SEQ ID NO. 61
KSVGGLQ	SEQ ID NO. 62
TCSRLLT	SEQ ID NO. 63
FCLLCHM	SEQ ID NO. 64
NRGRGYL	SEQ ID NO. 65
FFWSTAQ	SEQ ID NO. 66
FLFWGRT	SEQ ID NO. 67
VMLSTGP	SEQ ID NO. 68
GIVCLGR	SEQ ID NO. 69
GVHSRCG	SEQ ID NO. 70
YRGFPPP	SEQ ID NO. 71
ARGMPLF	SEQ ID NO. 72
CRDSCGR	SEQ ID NO. 73
GLLCGRD	SEQ ID NO. 74
IRVSYGR	SEQ ID NO. 75
WRRVGDLD	SEQ ID NO. 76
LGSGSWP	SEQ ID NO. 77
VFSPVNP	SEQ ID NO. 78
SLQSVVA	SEQ ID NO. 79
IRGIGGA	SEQ ID NO. 80
KVFARLG	SEQ ID NO. 81
VGRTVIQ	SEQ ID NO. 82
GLPRLSG	SEQ ID NO. 83
DCVWDCM	SEQ ID NO. 84

## Figura 1 (cont.)

GLGIYVL	SEQ ID NO. 85
FFITPRS	SEQ ID NO. 86
MGGSLFG	SEQ ID NO. 87
AARYGID	SEQ ID NO. 88
WRRSERT	SEQ ID NO. 89
KLSGVSL	SEQ ID NO. 90
WVGGIRG	SEQ ID NO. 91
IPRSTFG	SEQ ID NO. 92
VCWASWC	SEQ ID NO. 93
VRASPSL	SEQ ID NO. 94
PLLYRNA	SEQ ID NO. 95
LRSGRGS	SEQ ID NO. 96
WALTTAL	SEQ ID NO. 97
IVFGRGS	SEQ ID NO. 98
MRVFGGV	SEQ ID NO. 99
VLGSLGS	SEQ ID NO. 100
LWSEPMV	SEQ ID NO. 101
ERAPLKA	SEQ ID NO. 012
ISRFGYV	SEQ ID NO. 103
GLKFNWS	SEQ ID NO. 104
KSSEIPR	SEQ ID NO. 105
RRALFAT	SEQ ID NO. 106
GWRGLRT	SEQ ID NO. 107
DYFWFAD	SEQ ID NO. 108
SRYWTRS	SEQ ID NO. 109
RREGLRS	SEQ ID NO. 110
SWYTLRS	SEQ ID NO. 111
VSMSRSL	SEQ ID NO. 112
LAYRLRS	SEQ ID NO. 113
VYYGLRR	SEQ ID NO. 114
LYRLRS	SEQ ID NO. 115
LLYGLEW	SEQ ID NO. 116
VRPGLRS	SEQ ID NO. 117
IRSGFGS	SEQ ID NO. 118
LRSGRGS	SEQ ID NO. 119
AGFGMLL	SEQ ID NO. 120
VLGFSPW	SEQ ID NO. 121
HRRDHPE	SEQ ID NO. 122
ARGLQRR	SEQ ID NO. 123
GVGARRS	SEQ ID NO. 124
GMIIVGG	SEQ ID NO. 125
RrysADS	SEQ ID NO. 126



## Figura 1 (cont.)

SELGGGD	SEQ ID NO. 127
AGLSADI	SEQ ID NO. 128
TSGGGIV	SEQ ID NO. 129
VLFQVQP	SEQ ID NO. 130
DRVVGAW	SEQ ID NO. 131
VVEVAST	SEQ ID NO. 132
AVQDPRR	SEQ ID NO. 133
GPVTIDG	SEQ ID NO. 134
FKGPRLM	SEQ ID NO. 135
YRMIADW	SEQ ID NO. 136
FILGVRD	SEQ ID NO. 137
QTTYGDP	SEQ ID NO. 138
GGAVNVY	SEQ ID NO. 139
DVISDPL	SEQ ID NO. 140
VIVGVWF	SEQ ID NO. 141
GGIWVVI	SEQ ID NO. 142
VEAPDGT	SEQ ID NO. 143
LRFVGPR	SEQ ID NO. 144
FDERGSF	SEQ ID NO. 145
AGGTLGV	SEQ ID NO. 146
GTRLVLS	SEQ ID NO. 147
WGVLRD	SEQ ID NO. 148
KRIEDEL	SEQ ID NO. 149
RRTSIMA	SEQ ID NO. 150
EEFQSPD	SEQ ID NO. 151
LPRAVVE	SEQ ID NO. 152
PYEGPMPW	SEQ ID NO. 153
QGGETGYE	SEQ ID NO. 154
NQSLPSGN	SEQ ID NO. 155
GAQSTSSQ	SEQ ID NO. 156
PSSNRWFP	SEQ ID NO. 157
ALKAYHLP	SEQ ID NO. 158
GESAARVH	SEQ ID NO. 159
QPDNKHLF	SEQ ID NO. 160
TALKPSFH	SEQ ID NO. 161
YNRDTSML	SEQ ID NO. 162
TSAPTYES	SEQ ID NO. 163
LHHRVQKQ	SEQ ID NO. 164
PYSRNTLC	SEQ ID NO. 165
NCAKLPCV	SEQ ID NO. 166
YALTVNLG	SEQ ID NO. 167
GLSPSGEQ	SEQ ID NO. 168
KNSEAMFT	SEQ ID NO. 169
KWADCRRP	SEQ ID NO. 170

**Figura 1 (cont.)**

WPPCGWGCRGR	SEQ ID NO. 171
SISCLWGCGSW	SEQ ID NO. 172
GMGCLGLCGGS	SEQ ID NO. 173
GDGCPEVCFVP	SEQ ID NO. 174
YEMCDLSCVYW	SEQ ID NO. 175
RMPCSVSCDLM	SEQ ID NO. 176
GNSCSLHCYIW	SEQ ID NO. 177
ARLCGGACRGL	SEQ ID NO. 178
GEECAPGCTRG	SEQ ID NO. 179
DVDCRHL CNVH	SEQ ID NO. 180
PQLCGGT CRGL	SEQ ID NO. 181
VAGCPVGCIRG	SEQ ID NO. 182
LGYCSWGCARE	SEQ ID NO. 183
WPACSP ECRWP	SEQ ID NO. 184
TAGCGSMCLHV	SEQ ID NO. 185
LFLCVFGCALV	SEQ ID NO. 186
DVQCYVR CSPD	SEQ ID NO. 187
GGVCLGRCLGG	SEQ ID NO. 188
WRVCGALCGPA	SEQ ID NO. 189
SGRCLGVCGWA	SEQ ID NO. 190
AERCRMNCMKP	SEQ ID NO. 191
RKSCSGACVWG	SEQ ID NO. 192
GAACGSGCLHV	SEQ ID NO. 193
TGACIPGCGGW	SEQ ID NO. 194
QAPCVSGCGVD	SEQ ID NO. 195
RRWCGTLCLCW	SEQ ID NO. 196
YITCGHDCVTF	SEQ ID NO. 197
RRSCGFSCVAG	SEQ ID NO. 198
LRVCNVDCMTG	SEQ ID NO. 199
SLFCQIDCVMW	SEQ ID NO. 200
WDVCLSDCVFN	SEQ ID NO. 201

**Figura 2**

CCCTCATAGTTAGCGTAACG

SEQ ID NO. 202

Figura 3

